

DENISE APARECIDA NOGUEIRA DE LIMA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DO
ACUPONTO KUNLUN (BL60) EM CAMUNDONGOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito para a conclusão do
Curso de Graduação em Medicina.

Florianópolis

Universidade Federal de Santa Catarina

2008

DENISE APARECIDA NOGUEIRA DE LIMA

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIINFLAMATÓRIO DO
ACUPONTO KUNLUN (BL60) EM CAMUNDONGOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito para a conclusão do
Curso de Graduação em Medicina.

Presidente do Colegiado: Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereima

Professor Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos

Co-Orientador: MSc. Francisney Pinto do Nascimento

Florianópolis

Universidade Federal de Santa Catarina

2008

Lima, Denise Aparecida Nogueira de.
Evidência do efeito antinociceptivo e antiinflamatório do acuponto
Kunlun (BL60) em camundongos.
Florianópolis, 2008.
58p.

Orientador: Prof. Adair Roberto Soares dos Santos., Ph.D.
Trabalho de Conclusão de Curso – Universidade Federal de Santa
Catarina – Curso de Graduação em Medicina.

1. Dor 2. Inflamação 3. Acupuntura

*Dedico aos meus pais Agnaldo e
Mária Lúcia, pela dedicação,
pela atenção e por me ensinarem
valores de ética e amor!*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora de Aparecida por estarem comigo em todos os momentos, ajudando a superar os percalços do caminho.

Aos meus pais, Agnaldo e Maria Lúcia, porto seguro, fonte inspiradora, mais do que conselheiros, amigos, confidentes. Obrigado paizinho e mãezinha por cuidarem de mim sempre, me abraçando nos momentos felizes e me pegando no colo nos momentos difíceis.

Ao professor Adair, pela dedicação, pelo entusiasmo, pela incansável busca para que todos os seus alunos aprendam o sabor pela ciência. Ao amigo Adair, brincalhão, estressado, conselheiro, que fez parte de quase toda minha formação acadêmica e que me ajudou sempre com competência e paciência, e auxiliou no meu crescimento profissional e pessoal. “Obrigado Teacher!”

Aos meus irmãos Elaine, Márcio, Júnior e Lennon e irmãos “agregados” Márcia e Alexandre, pela fiel torcida, pela parceria sempre, e por mesmo de longe estarem sempre presentes na minha vida.

Ao meu namorado Francisney, meu amor, parceiro nos momentos felizes e companheiro nos momentos tristes. Por entender meus horários malucos e meus eternos plantões, por me ajudar com paciência o desenvolver deste trabalho, e pelo amor e carinho dedicados sempre.

Ao Professor Armando d’Acampora, que não esteve ligado diretamente a esse trabalho, mas me ensinou lições de responsabilidade e caráter que levarei por toda minha vida.

A todos os colegas de faculdade, em especial a família que construí: Rodrigo Paulino, Lilly Ainchinger, Karina Giassi, Juliano Vargas, e a minha amiga-irmã Monique Sousa, presentes em quase todos os bons e maus momentos dessa jornada.

Aos amigos do laboratório que aprendi a amar e respeitar. Com carinho especial a Marina Córdova, Débora Lansnaster e Camila Ribas, por serem minhas amigas, confidentes e parceiras de festas. A Morgana Duarte, por me ajudar com os experimentos e principalmente por ser minha amiga, paciente e atenciosa sempre. Ao Daniel Martins e Leidiane Mazzardo pelo jeito carinhoso para comigo e pelas grandes idéias, a Cris Setim e Cris Baggio, parceiras do overnight lounge club e Vanessa Emmel por me apresentar ao mundo da Medicina Chinesa. Ao Francisco por me ajudar no meu inglês, e “melhorar” meu abstract.

Aos meus irmãos de Floripa, Alisson Bento e Rodrigo Marcon, pela cumplicidade, pelo carinho, pelas festas, e por estarem comigo em todos os momentos.

Em especial a Mariah Ghizoni Vieira (em memória) pelas risadas, pelo jeitinho carinhoso, pela simpatia. “Estará sempre conosco amiga!”

Aos animais utilizados, ferramentas de estudo e de trabalho. Meu profundo respeito.

E por fim, a todas as pessoas que torceram por mim e todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte da minha trajetória.

RESUMO

Introdução: A acupuntura consiste na inserção de agulhas em regiões específicas do corpo, para efeito terapêutico. **Objetivo:** Avaliar a atividade antinociceptiva e antiinflamatória da acupuntura realizada no acuponto Kunlun (BL60) **Métodos:** Utilizaram-se camundongos Swiss machos e fêmeas (25-35g, N= 8-10). A agulha foi inserida no acuponto Kunlun (BL60) por 10 minutos, e depois se avaliou a atividade antinociceptiva do acuponto nos modelos de nocicepção induzido pela formalina, pelo ácido acético, pela constrição parcial do nervo ciático e pelo CFA. A possível interação do acuponto com citocinas pró-inflamatórias foi investigada através da administração intratecal de TNF- α e IL-1 β . Também se avaliou o efeito antiinflamatório do acuponto Kunlun no modelo de peritonite induzido pela injeção intraperitoneal de carragenina. **Resultados:** O acuponto Kunlun reduziu a nocicepção induzida pela formalina na fase neurogênica ($61\pm 5\%$) e na fase inflamatória ($53\pm 6\%$). Mostrou-se efetivo em reduzir a hipernocicepção mecânica nos modelos de dor crônica. Também diminuiu significativamente a migração de leucócitos após a injeção de carragenina ($71\pm 7\%$), bem como à redução no número de neutrófilos ($89\pm 2\%$) que foi confirmada pela avaliação da atividade da MPO ($81\pm 12\%$), todavia não alterou a migração de mononucleares ou extravasamento plasmático. O acuponto também reduziu de forma significativa o tempo de resposta induzido pela injeção de TNF- α ($76\pm 10\%$) e de IL-1 β ($73\pm 10\%$). **Conclusão:** Nossos resultados demonstram que a estimulação do acuponto Kunlun (BL60) exibe efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção agudo e crônico, além de ser capaz de reduzir a resposta inflamatória induzida por carragenina e de inibir a nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias.

ABSTRACT

Introduction: Acupuncture consists in inserting fine needles into specific points of the body for therapeutic effects. **Objective:** To investigate the possible antinociceptive and anti-inflammatory effect of acupuncture in acupoint 'Kunlun' (BL60). **Methods:** Male and female Swiss mice were used (25-35g, N= 8-10). The needle was inserted in Kunlun acupoint (BL60) and retained for 10 minutes. Immediately after removal of the needle, the antinociceptive activity of acupuncture was evaluated. The following models of nociception were used: formalin, acetic acid, partial constriction of the sciatic nerve and CFA. The possible interaction of the acupoint with pro-inflammatory cytokines was investigated through the administration of TNF- α and IL-1 β . In addition, the anti-inflammatory effect of Kunlun acupoint was evaluated in the mouse model of peritonitis induced by carrageenan. **Results:** Kunlun acupoint reduced nociception caused by formalin in both neurogenic ($61\pm5\%$) and inflammatory ($53\pm6\%$) phases. This acupoint was also effective in reverting mechanic antinociception in models of chronic pain. Kunlun (BL60) also caused significant decrease in leukocyte migration which follows carrageenan injection ($71\pm7\%$), as well as reduction of neutrophil influx (inhibition: $89\pm2\%$) confirmed by evaluation of MPO activity ($81\pm11\%$), however it did not alter mononuclear migration or plasmatic exudation. The acupoint also caused marked inhibition of the nociceptive response induced by intrathecal administration of TNF- α ($76\pm10\%$) and IL-1 β ($73\pm10\%$). **Conclusion:** Our results demonstrate that the stimulation of the Kunlun (BL60) acupoint causes antinociceptive activity in models of acute and chronic nociception, reduction of induced inflammatory response caused by carrageenan and inhibition of nociception induced by pro-inflammatory cytokines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
ρg	Picograma
a.C	Antes de Cristo
μ	Micro
μV	Micro-volts
μg	Micrograma
μL	Microlitro
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
ACTH	Corticotropina
AINES	Antiinflamatórios não-esteroidais
AMH	Fibra A mecânico-térmico sensível
ANOVA	Análise estatística de variância
ATP	Trifosfato de adenosina
BL60	Acuponto Bexiga 60
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CFA	Adjuvante Completo de Freud

Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CMH	Fibra C mecânico-térmico sensível
CRH	Hormônio liberador de corticotropina
COX-2	Cicloxygenase 2
CV12	Acuponto vaso concepção 12
EPM	Erro padrão da média
Fig	Figura
GABA	Ácido-gama aminobutírico
GB34	Acuponto Vesícula biliar 34
GDNF	Fator neurotrófico derivado de células gliais
h	Hora
H2O2	Peróxido de Hidrogênio
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL	Interleucina
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IM	Intra-muscular
In	Inibição
i.p	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
i. t.	Intratecal

i.v.	intra-venoso
JCAHO	Comissão Conjunta de Acreditação de Organizações de Saúde
Kg	Kilograma
L5	Vértebra lombar 5
L6	Vértebra lombar 6
LI10	Acuponto Intestino Delgado 10
LR3	Acuponto Fígado 3
mg	Miligrama
min	Minuto
ml	Mililitro
MMII	Membros inferiores
mm	Milimetro
MPO	Mieloperoxidase
MTC	Medicina Tradicional Chinesa
NaCl	Cloreto de sódio
NO	Óxido nítrico
PC6	Acuponto Pericárdio 6
R	Receptor
R1	Acuponto Rim 1
RNA _m	Ácido ribonucléico (mensageiro)
s	Segundo
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central

SP	Substância P
SP9	Acuponto Baço Pâncreas 9
ST36	Acuponto Estômago 36
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UI	Unidades Internacionais

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Tipos de fibras nociceptivas	4
Figura 2 - Agulhas de osso.....	8
Figura 3 - Modelo humano demonstrando trajeto dos meridianos.....	10
Figura 4 - Acuponto Kunlun (BL60)	12
Figura 5 - Ponto Kunlun	15
Figura 6 - Falso acuponto (Sham)	15
Figura 7 - Constrição parcial do nervo ciático	17
Figura 8 - Efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) no modelo de formalina (decurso temporal), com duração do estímulo de 1, 5, 10 e 30 minutos em relação à primeira fase (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos.	21
Figura 9 - Comparação entre a atividade antinociceptiva do acuponto Kunlun (BL60), uni ou bilateral, na nocicepção induzida por ácido acético 0,6% em camundongos.....	22
Figura 10 – Decurso temporal do efeito do tratamento com o acuponto Kunlun (BL60) na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos	23
Figura 11 - Efeito do agulhamento no acuponto Kunlun (BL60), 2 horas após o tratamento diário, na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos.....	24
Figura 12 – Decurso temporal do efeito do agulhamento do acuponto Kunlun (BL60) sobre a alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos.....	25
Figura 13 - Efeito da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) 4 horas após o tratamento diário, na alodínia induzida pela injeção de CFA..	26
Figura 14 - Efeito antinociceptivo do tratamento com o acuponto Kunlun, em relação a nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- α e IL-1 β , em camundongos.	27
Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com acupuntura no acuponto kunlun por 10 minutos, na peritonite induzida pela carragenina em camundongos. Os leucócitos totais (A), o número de polimorfonucleares (B), o extravasamento de azul de Evans (C) e o número de mononucleares (D) foram medidos 4 horas após a administração intraperitoneal de carragenina na presença e na ausência do tratamento com a acupuntura.	28
Figura 16 - Efeito do tratamento da acupuntura no acuponto kunlun durante 10 minutos sobre o aumento da atividade da MPO, induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos.	29

SUMÁRIO

RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	xiii
SUMÁRIO	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Dor.....	1
1.1.1 Dor inflamatória	5
1.1.2 Dor neuropática	6
1.2 Acupuntura	8
1.3 Acuponto Kunlun (BL60)	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1. Animais	14
3.2 Acupuntura	14
3.3 Fármacos	15
3.4 Modelos Experimentais de Nocicepção	15
3.4.1 Nocicepção Induzida por Formalina	15
3.4.2 Nocicepção induzida por ácido acético	16
3.4.3 Alodínia mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freud (CFA)	16
3.4.4 Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático.....	17
3.4.5 Nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α	18
3.5. Modelos experimentais de inflamação	19

3.5.1 Modelo de peritonite aguda induzida por carragenina (Cg)	19
3.5.2 Aumento da atividade da MPO, no modelo de peritonite aguda induzida por carragenina .	20
3.6 Análise estatística	20
4 RESULTADOS	21
4.1 Nocicepção induzida pela formalina	21
4.2 Nocicepção induzida pelo ácido acético e comparação entre o tratamento unilateral e bilateral	21
4.3 Neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático	22
4.4 Alodínia mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freud (CFA)	24
4.5 Nocicepção induzida pela injeção intratecal de IL-1 β e TNF- α	26
4.6 Peritonite induzida por carragenina	27
4.7 Efeito sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Cg	28
5 DISCUSSÃO	30
6 CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

1.1 Dor

O corpo humano possui inúmeros mecanismos de controle da homeostasia, entre eles a dor exerce uma função importante, pois seu papel fisiológico é alertar acerca de possíveis ameaças ao bem estar e a integridade do organismo, e reter nossa atenção até que a causa de sua ativação tenha sido identificada e afastada¹. Neste sentido, a dor é um sintoma clinicamente importante de precaução e, conseqüentemente, limitação de possíveis danos^{2,3,4}, sendo esta a reação mais comum entre os indivíduos que procuram atendimento médico. Porém, a dor quando persistente provoca reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento^{1,5,6}.

Clinicamente, a dor é um sintoma ainda mal controlado em todo o mundo. Em 1991, nos EUA, das sete milhões de pessoas portadoras de neoplasias, 70% experimentavam dor moderada ou severa, que fazia necessário o uso de opióides em algum estágio de sua doença, sendo que 50% a 80% destes não obtinham analgesia adequada. A prevalência diária mundial de dor neoplásica é de 4 milhões de pessoas e a prevalência anual é de 19 milhões⁷. Em um estudo brasileiro, dos 150 pacientes participantes da pesquisa, 74,64% procuraram os serviços de saúde por estarem sentindo alguma dor. O local mais citado de dor foi a cabeça (46% dos pacientes). Dores crônicas afetam 75% dos pacientes. Em função das dores, 41,07% dos pacientes foram impedidos de realizar suas atividades diárias e 10,71% tiveram que ser afastados de seu trabalho. Isto sugere que a dor pode ser considerada um problema de saúde pública para esta população, e causa impacto não somente para os doentes, mas também para toda a sociedade, acarretando prejuízos socioeconômicos consideráveis⁹.

Desde janeiro de 2000, a *Joint Commission on Accreditation on Healthcare Organizations* (JCAHO) publicou norma que descreve a dor como quinto sinal vital. Portanto, ela deve ser sempre avaliada e registrada ao mesmo tempo em que são verificados os outros sinais vitais. Esse ato é necessário para que exista conhecimento da conduta tomada, sua razão e seus resultados. A queixa de dor deve ser sempre valorizada e respeitada, devido ao desconforto que manifesta⁹.

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”⁵. Dentre os transtornos que comumente

ocorrem em pacientes que apresentam dor com quadros de hipersensibilidade, pode-se citar a hiperalgesia (resposta nociceptiva exacerbada para estímulos previamente nocivos) e a alodínia (resposta nociceptiva para estímulos não nocivos)².

A partir desta definição, pode-se citar um componente fisiológico e outro psicológico, e a junção de ambos são o que os humanos entendem por dor. Sendo assim, em animais avalia-se a dor de forma indireta, uma vez que não há aparatos que permitam mensurar algum componente emocional de maneira confiável, avalia-se somente o componente fisiológico da dor, ao qual se denomina nocicepção¹⁰.


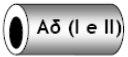

Aproximadamente um século atrás, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário que é ativado por estímulos capazes de gerar dano tecidual. De acordo com esse modelo de Sherrington, os nociceptores têm limiares característicos que os distinguem de outras fibras nervosas sensoriais. Eles estão amplamente distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras e são sensíveis a estímulos térmicos, mecânicos e químicos⁵. A função de alerta da dor reflete a ativação fásica desses nociceptores, os quais são ativados quando o estímulo é potencialmente perigoso, ou seja, excedem uma determinada faixa considerada fisiológica^{2,11}.

A sensibilização dos nociceptores ocorrida, por exemplo, em casos de mudança de temperatura (estímulo nocivo térmico), diferença osmótica ou distensão do tecido (estímulo nocivo mecânico), resulta na liberação local de mediadores químicos tais como prostaglandinas, bradicinina, prótons, serotonina, histamina, metabólitos do ácido araquidônico, ATP, citocinas, aminoácidos excitatórios, substância P (SP), óxido nítrico (NO) entre outros^{5,6}. Estes mediadores interagem com receptores específicos, levando a uma propagação do sinal nociceptivo graças a um aumento na permeabilidade da membrana neuronal a cátions e conseqüente geração do potencial de ação^{12, 13, 14}. É importante ressaltar que estes mediadores podem ser liberados não somente pelos neurônios sensoriais, mas também por fibras simpáticas e por células não neuronais como plaquetas, células endoteliais, fibroblastos, células de Schwann e células inflamatórias¹⁵.

Quando estímulos térmicos, mecânicos ou químicos ativam neurônios sensoriais primários nociceptivos, inicia-se o processo doloroso. Os nociceptores conduzem informações nociceptivas da pele, órgãos e tecidos internos para a medula espinhal. Os corpos celulares dos neurônios aferentes primários estão localizados nos gânglios da raiz dorsal. Os neurônios do gânglio da raiz dorsal emitem projeções em duas direções, para a periferia e ao corno dorsal da medula espinhal^{14,15}.

Os nociceptores são classificados de acordo com suas características anatômicas, de velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização (Figura 1). As fibras de pequeno diâmetro são as que originam a maioria dos nociceptores. Dentre estas fibras, a nomenclatura CMH e AMH é muitas vezes utilizada para se referir às fibras C mecânico-calor-sensíveis (*do inglês, mechano-heat-sensitive*) e fibras A mecânico-calor-sensíveis (*do inglês, mechano-heat-sensitive*), respectivamente¹⁶. As fibras A δ são pouco mielinizadas e podem ser divididas em duas classes principais, onde se diferenciam pela temperatura de ativação. As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas inferiores à 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas inferiores à 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é a chamada primeira dor, e ocorre em uma velocidade entre 12 e 30 m/s^{2,5,14} (Figura 1). As fibras C, que a maioria é também conhecida como fibras polimodais por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, a chamada segunda dor, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina^{2, 5,17} (Figura 1). As fibras mais grossas e com maior mielinização são as fibras A α e A β , estas fibras transmitem informações numa velocidade em torno de 30 a 100 m/s. Elas respondem a um leve toque ou movimento, são encontradas basicamente nos nervos que inervam a pele, e nos indivíduos normais não contribuem para a dor. Entretanto em alguma situação patológica, devido à uma sensibilização, elas podem contribuir para a alodínia mecânica^{2,5,18} (Figura 1).

A

Tipo de fibra	 Aα e Aβ	 Aδ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10μm	2 - 6μm	0.4 - 1.2μm
Velocidade de condução	30 - 100m/s	1.2 - 30m/s	0.5 - 2m/s
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Nocicepção (térmica, mecânica e química)	Nocicepção (térmica, mecânica e química)

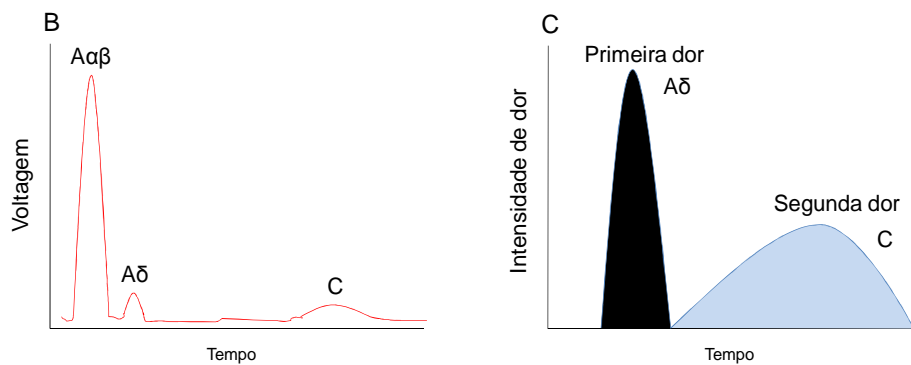


Figura 1 - A - Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia para o SNC. B - Descarga elétrica de fibras nociceptivas. C - Relação intensidade X tempo da dor. (Adaptado de Julius e Basbaum⁵)

Para simplificar a compreensão das conexões e terminações dos neurônios no corno dorsal da medula espinhal, este foi dividido em lâminas de I a VI, sendo a lâmina I a mais superficial e a lâmina VI a mais profunda. As fibras Aβ responsáveis por sensações mecânicas e de propriocepção terminam em lâminas mais profundas, como III, IV, V e VI. As fibras Aδ que respondem a estímulos nocivos terminam nas lâminas I e V, enquanto que as fibras Aδ sensíveis mecanicamente realizam conexões nas lâminas II e III. As fibras C, que são os principais nociceptores terminam nas lâminas I e II ^{14,15}.

1.1.1 Dor inflamatória

Na maioria das situações, o processo inflamatório pode estar relacionado aos mecanismos que envolvem a dor¹⁹. Dessa forma a inflamação caracteriza-se por um fenômeno complexo, que geralmente é associado à dor. E ela pode ser desencadeada por lesões térmicas, traumas mecânicos, invasão com agentes infecciosos e reações antígeno-anticorpo²⁰.

Os sinais clínicos da inflamação, como eritema, calor, edema e dor foram descritos no início da era clássica pelos gregos e romanos²¹. O quinto sinal da inflamação, lesão aguda dos tecidos, com perda da função dos órgãos foi mencionado mais tarde por Virchow, no século XIX²². Tais sinais estão diretamente relacionados às várias fases do processo inflamatório; que é caracterizado por três fases distintas, cada uma delas aparentemente mediada por mecanismos diferentes: sendo a primeira aguda, uma segunda subaguda relacionada à resposta imune e migração celular e uma terceira proliferativa, com regeneração tecidual e fibrose²³. A fase aguda caracteriza-se por um aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar. Nesta fase alguns mediadores são liberados, sendo os mais importantes as cininas, histamina, serotonina, leucotrienos, prostaglandinas e neuropeptídeos liberados localmente nas terminações nervosas²³. Estes mediadores promovem no local da lesão, primeiramente uma dilatação arteriolar e após, um aumento da microcirculação com ativação de vasos hipofuncionantes, causando calor e rubor característicos de reação inflamatória, facilitando o movimento de exsudato para tecidos extra vasculares, sendo que o mesmo facilita a liberação de outros mediadores, o que amplifica a resposta inflamatória²⁴.

Na segunda fase da resposta inflamatória, ocorre a liberação de vários mediadores e citocinas que promovem a quimiotaxia de leucócitos e outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória. Estes agentes quimiotáticos podem também ser de origem exógena como os liberados por microorganismos²⁵. A inflamação aguda pode finalizar-se com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo^{25,26}.

A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração de células mononucleares, que incluem macrófagos, linfócitos e plasmócitos, ocorrendo destruição tecidual e tentativa de reparo mediante a substituição por tecido conjuntivo. A reação inflamatória crônica pode ocorrer quando o organismo não é capaz de neutralizar o agente agressor. Pode ocorrer devido a infecções persistentes por determinados

microorganismos, como o bacilo da tuberculose ou ainda, estar ligada a processos inflamatórios auto-imunes como a artrite²⁶.

A liberação de mediadores, em tecidos inflamados pode sensibilizar fibras nociceptivas periféricas, promovendo a facilitação central da transmissão nociceptiva^{14,27}, levando a uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nocivo, chamado de hiperalgesia^{2,10,27,28}. Alteração na percepção sensorial, envolvendo sensibilização central, pode levar a alodínia, que está relacionada à dor evocada por um estímulo normalmente não nocivo².

O processo inflamatório resulta da liberação de vários mediadores, alguns deles com propriedades neuroativas que ativam ou sensibilizam os nociceptores locais das fibras aferentes periféricas (C e A δ)^{15,19, 28}.

Atualmente, vários medicamentos encontram-se disponíveis para uso clínico como analgésicos e/ou antiinflamatórios, como os corticosteróides, os opióides e os AINEs. Os glicocorticóides possuem grande amplitude de ações farmacológicas, dentre elas, seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores, inibindo tanto as manifestações iniciais quanto as tardias do processo inflamatório²⁶. Apesar destas classes de substâncias apresentarem excelentes propriedades antiinflamatórias (com exceção dos opióides) e serem utilizadas na terapêutica clínica, seu uso produz importantes efeitos colaterais. Tal fato encoraja a busca por alternativas terapêuticas com menos efeitos indesejáveis.

1.1.2 Dor neuropática

A dor neuropática é uma dor crônica causada como consequência direta de alguma lesão ou doença de parte do sistema nervoso²⁹. A principal sintomatologia clínica das neuropatias periféricas inclui dor espontânea ou hipersensibilidade da área afetada, levando à hiperalgesia ou alodínia³⁰, que ocorrem principalmente devido às alterações ocorridas na medula espinhal^{3,31,32}. Em algumas situações, a dor neuropática pode estender-se além dos limites dos nervos lesados, manifestando-se bilateralmente, o que sugere alterações nos mecanismos centrais de processamento da informação nociceptiva^{32,33}.

Devido a sua longa duração, a dor crônica perde a função de manter a homeostase e de ser sinal de alerta, causa comprometimento funcional, sofrimento, incapacidade progressiva e custo socioeconômico. Sabe-se que a presença de dor crônica, independentemente da patologia de base, tem implicações na saúde dos pacientes. Isto faz com que esse sintoma mereça a atenção especial dos profissionais de saúde³⁴.

Segundo Teixeira³⁵, mais de um terço da população brasileira julga que a dor crônica compromete as atividades habituais e mais de três quartos considera que a dor crônica é limitante para as atividades laborais e para as relações sociais e familiares. Os indivíduos idosos estão expostos a afecções traumáticas, infecciosas e crônico-degenerativas causadoras de dor. Admite-se que no Brasil, 25% a 80% dos indivíduos com mais de 60 anos de idade apresentem dor crônica³⁴.

Um dos mecanismos que pode contribuir para a alodínia mecânica está relacionado à perda de neurônios, principalmente as fibras do tipo C, devido a sua compressão. Com isso, as fibras A β , que normalmente ocupam a lâmina III do corno dorsal, passam então a brotar para as lâminas mais superficiais da medula (I e II), ocupando os espaços anteriormente ocupados pelas terminações centrais das fibras C. Desta forma são formadas novas sinapses entre fibras A β e neurônios nociceptivos secundários que normalmente respondem a estímulos nocivos^{31,36}.

Já a hipersensibilidade ocorre em função de uma estimulação repetitiva sobre as fibras do tipo C, o que resulta em uma prolongada descarga no corno dorsal da medula espinhal. Este fenômeno é conhecido como “wind up”³⁷ e significa um aumento progressivo no número de potenciais de ação por estímulo que ocorre em neurônios do corno dorsal. Estes episódios repetitivos de “wind up” podem levar à potenciação a longo prazo (“Long-Term Potentiation”, LTP), a qual envolve um aumento prolongado na transmissão sináptica. Um dos fatores que levam ao “wind up” é o aumento na expressão de canais de sódio resistentes à tetrodotoxina e diminuição na expressão de canais de potássio após a lesão do nervo²⁹.

Outra alteração na medula espinhal responsável pela dor crônica é a diminuição da neurotransmissão inibitória, principalmente no que se refere à neurotransmissão GABAérgica³¹. A eficácia reduzida dos opióides endógenos também contribui para a diminuição da inibição da dor²⁹.

Na dor neuropática, assim como acontece no processo inflamatório, a ação dos mediadores sobre seus receptores, tanto em nervos periféricos quanto centrais, inicia uma cascata de sinalização que culmina na manutenção do potencial de ação. Dessa forma, o envolvimento das células gliais periféricas na dor neuropática, parece estar relacionado à liberação de mediadores inflamatórios^{29,38}. Por ser uma condição crônica, a principal característica desta patologia é a mudança plástica causada pela alteração na expressão gênica de receptores, canais iônicos, proteínas intracelulares, neuromoduladores e mediadores de sinalização extracelular, entre outros^{31,33}.

O tratamento da dor neuropática é um dos mais difíceis entre os diferentes tipos de dor. Geralmente a terapia medicamentosa apresenta reduzida eficácia e/ou seu efeito na maioria dos casos torna-se ineficaz. Pacientes com dor neuropática geralmente não respondem ao uso de antiinflamatórios não-esteroidais e são resistentes ou insensíveis aos opióides, embora recentemente exista controvérsia sobre a frequência destas características. Atualmente o tratamento é realizado com a utilização de antidepressivos tricíclicos, inibidores da recaptação de serotonina, anticonvulsivantes e capsaicina de uso tópico (creme ou pomada), entre outros. Entretanto, estes fármacos apresentam limitada eficácia e/ou efeitos colaterais^{29,34,39}. Dessa forma, faz-se necessária a pesquisa de novas alternativas terapêuticas que sejam eficazes no tratamento da dor neuropática.

1.2 Acupuntura

A acupuntura é uma das terapias médicas complementares mais conhecidas com finalidades preventivas e terapêuticas, a qual tem sido importante para os povos orientais há milhares de anos^{40,41}. Há relatos de agulhas de pedra, ossos e de espinha de peixe que foram utilizadas na China durante a Idade da Pedra (cerca de 3000 anos a.C.)⁴⁰ (figura 2).

A acupuntura faz parte de um conjunto de conhecimentos teóricos empíricos da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que inclui técnicas de massagem (Tui-Na), exercícios respiratórios (Qi-Gong), orientações nutricionais (Shu-Shieh), e a farmacopéia chinesa (medicamentos de origem animal, vegetal e mineral). Ela é utilizada para tratar diversas patologias, inclusive alguns tipos de dores intratáveis na medicina ocidental⁴².

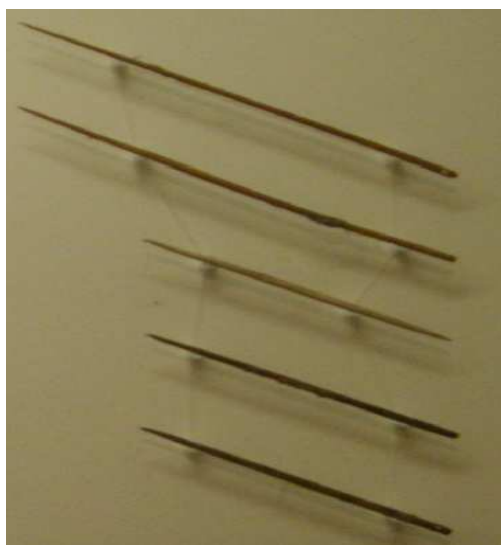


Figura 2 - Agulhas de osso (Museu de Medicina Tradicional Chinesa, Universidade de Shanghai)⁴³

Os conhecimentos da acupuntura estiveram isolados do mundo ocidental por cerca de 5000 anos, distanciando a forma de raciocínio e linguagem ⁴⁰. Na medicina oriental, o corpo humano é considerado como uma complexa rede de processos relacionados entre si através de duas forças opostas: o Yin e o Yang. A saúde é vista como a manutenção do equilíbrio e harmonia do Yin e Yang, enquanto a doença é vista como um desequilíbrio e desarmonia entre essas duas forças. Nesse sentido, a acupuntura é uma importante modalidade de manipulação e balanceamento do Yin e Yang ^{41,43}.

Consiste na inserção de agulhas e/ou transferência de calor em áreas definidas da pele e tecidos subjacentes, denominados acupontos. Estes foram empiricamente determinados no transcorrer de milhares de anos de prática médica. Acuponto é uma região da pele em que é grande a concentração de terminações nervosas sensoriais. Essa região encontra-se em relação íntima com nervos, vasos sanguíneos, tendões, periósteo e cápsulas articulares. Sua estimulação possibilita acesso direto ao SNC. Estudos morfofuncionais identificaram plexos nervosos, elementos vasculares e feixes musculares como sendo os mais prováveis sítios receptores dos acupontos ^{40, 41, 44}.

Tradicionalmente é descrito um sistema de Meridianos ou Canais que conduzem energia, ou seja, *Qi*, pelo organismo. São constituídos basicamente de 12 pares de Meridianos Principais ou Regulares e 2 pares de Meridianos, Vaso Governador e Vaso Concepção, respectivamente nas linhas média dorsal e ventral (figura 3). Em cada membro locomotor podemos encontrar 3 Meridianos Principais na face dorsal ou cranial e 3 na face ventral ou caudal, que se relacionam entre si e são integrados aos órgãos internos. Recebem a nomenclatura de: Pulmão, Intestino Grosso, Estômago, Baço-Pâncreas, Coração, Intestino Delgado, Bexiga, Rim, Pericárdio, Triplo Aquecedor, Vesícula Biliar e Fígado ⁴¹. Nos Estados Unidos e na Europa, ao invés dos nomes chineses tradicionais dos acupontos, são identificados por um código alfanumérico, demonstrando o Meridiano onde se localiza e o seu número sobre o mesmo ^{40,41}.



Figura 3 - Modelo humano demonstrando trajeto dos meridianos (Museu de Medicina Tradicional Chinesa de Beijing)⁴³

Acupuntura pode ser aplicada a cada 2 ou 3 dias em casos agudos e em casos crônicos uma vez por semana durante 4 a 8 semanas. Quando o quadro se estabiliza, pode-se diminuir a frequência a intervalos quinzenais e posteriormente avaliar a cada 3 a 6 meses, de acordo com o diagnóstico baseado na MTC. Devido a sua abordagem diferente na saúde e na doença, é usada integrando outros tratamentos para muitas patologias ⁴⁴.

Embora tenha sido introduzida relativamente recentemente, a acupuntura tem ganhado popularidade e grande aceitação nos países ocidentais⁴¹. Nas últimas décadas, aumentou o interesse pelo estudo da acupuntura e seus mecanismos de ação. Os mecanismos de ação propostos para os efeitos terapêuticos da acupuntura são baseados no princípio de manter ou recuperar a homeostase.

Yamamura et al.⁴⁵, investigaram propriedades biofísicas das agulhas de acupuntura para uma melhor compreensão dos seus efeitos elétricos, onde concluíram que as agulhas desenvolveram um potencial elétrico na ponta, isoladamente de 1800 μV , capaz de provocarem a despolarização da membrana da célula nervosa. Desta forma o estímulo da acupuntura é transmitido do acuponto para a medula espinal através dos nervos periféricos aferentes. Como mecanismo local da acupuntura, é relatado além do efeito de relaxamento muscular ⁴⁶, estímulo à regeneração tecidual, a promoção de uma alteração elétrica, seja pela presença da agulha ou por eletroacupuntura ^{46, 47}.

De acordo com Langevin,⁴⁸, a manipulação da agulha de acupuntura provoca uma deformação do tecido conjuntivo, composto por matriz extracelular e fibras de colágeno, havendo a transmissão de sinal mecânico dentro de fibroblastos e outras células aderidas às fibras de colágeno e uma resposta celular de rearranjo no citoesqueleto, estimulando vários sensores mecano-receptores e/ou nociceptores. Este efeito é importante, pois não se restringe ao local da agulha de acupuntura, podendo se espalhar aos planos de tecido conjuntivo intersticial. Geram também alterações no fluxo sanguíneo, citocinas e/ou fatores de crescimento que resultam na modulação em longo prazo da informação sensorial e o efeito da acupuntura que podem durar horas ou dias.

São relatados tanto efeitos sistêmicos devido a participação dos centros superiores do SNC e efeitos locais relacionados à liberação de diversas substâncias e neurotransmissores: histamina, bradicinina, prostaglandina, serotonina, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), β -endorfinas, encefalina e dinorfinas, noradrenalina, acetilcolina, adenosina, somatostatina, ácido gama-aminobutírico, vasopressina, angiotensina, corticotropina (ACTH), colecistocinina, ácido glutâmico e citocinas⁴⁶.

A participação de receptores tipo polimodais tem sido evidenciada no mecanismo periférico da acupuntura. Estes receptores polimodais respondem a estímulos mecânicos, químicos e térmicos e consistem em terminações nervosas livres. Localizam-se em diversos tecidos, podendo estar sensibilizados e presentes nos pontos gatilho. Sabe-se que muitos pontos-gatilho correspondem a pontos de acupuntura⁴⁹.

Acredita-se também que o efeito analgésico da acupuntura é devido à ativação do sistema de modulação descendente da dor. Quando um acuponto é estimulado, ele ativa fibras aferentes primárias, que por sua vez, ativam vias ascendentes que ativam o sistema modulador da via descendente da dor, incluindo a substância cinzenta periaquedutal, rafe magno, locus coeruleus, núcleo medial central do tálamo e hipotálamo posterior. Opióides endógenos como encefalinas e monoaminas são importantes mediadores conhecidos na analgesia induzida por acupuntura^{43, 50}.

Os resultados da acupuntura estão relacionados ao estímulo que é feito no acuponto, ou seja, intensidade, duração e frequência do estímulo^{41,44}. As baixas frequências liberam encefalina e endorfina por todo Sistema Nervoso Central, promovendo efeito na atividade visceral. Isto é confirmado com a inibição dos seus efeitos por naloxona, um antagonista opióide. Frequências mais altas liberam dinorfina na medula espinhal^{43,44}.

Recentemente, muitos esforços foram realizados para se estabelecer as propriedades e características dos mecanismos da acupuntura em termos de neuroanatomia, neurofisiologia e

neuroquímica. Entretanto, a maioria dos estudos é publicada em chinês, deixando ainda muitas questões em aberto ⁵¹.

1.3 Acuponto Kunlun (BL60)

A grande maioria dos estudos não propõe mecanismos de ação dependentes da seleção de pontos. No entanto, parte dos trabalhos publicados trabalha com o acuponto ST36 (Zusanli) e com a técnica de eletroacupuntura ⁵⁰⁻⁵³.

O acuponto escolhido para este trabalho chama-se “Kunlun” (BL60), que significa “grande e alto” e é indicado para tratar patologias da região alta do corpo, como ombros, pescoço e cabeça. Está localizado a meia distância entre o maléolo lateral e o tendão do calcâneo, no meridiano da Bexiga (figura 4). Além disso, o seu nome também faz analogia a um conjunto de montanhas (chamadas Kunlun), localizadas na província de Sichuan na China, que em seu vale passa o rio Yang Tse, o maior rio da China: o meridiano da Bexiga é o maior meridiano do corpo (para a Medicina Chinesa, os meridianos são como rios de energia) e o ponto localiza-se ao lado do maléolo lateral (em analogia às montanhas). As funções deste ponto são para o tratamento de diversas patologias, entre elas cefaléias, rigidez no pescoço, obscurecimento da visão, epistaxe, espasmo e dor no ombro, lombalgias, dores em MMII, epilepsia, distocia, alterações menstruais e cistite ^{43,44,56}.

Poucos estudos foram publicados com o ponto Kunlun (BL60), nenhum deles com o uso isolado. O conjunto de acupontos: Kunlun (BL60), ST36 (Zusanli) e GB34 (Yanglingquan) com o uso de eletroacupuntura, não reduziram o requerimento de desflurano em anestesia em humanos ⁵⁴. Em outro estudo realizado com pacientes portadores do vírus HIV que apresentaram neuropatias, devido ao uso de drogas antiretrovirais, foi demonstrado que a eletroacupuntura nos pontos BL60, R1, LR3 e ST36 melhorou a condição geral destes pacientes, aumentando a aptidão física, resposta muscular e reflexo tibial ⁵⁵.



Figura 4 - Acuponto Kunlun (BL60) – Adaptado de Lian et al ⁵⁵

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a ação antinociceptiva e antiinflamatória da estimulação do acuponto Kunlun (BL60), em modelos animais que utilizam estímulos químicos e mecânicos em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar a ação antinociceptiva da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) em modelos químicos de nocicepção induzida pela formalina e ácido acético em camundongos.
2. Analisar o efeito da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) sobre a alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA.
3. Analisar o possível efeito da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) sobre a alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela ligadura parcial do nervo ciático.
4. Investigar a provável ação antinociceptiva da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) no modelo de nocicepção química induzida pela injeção intratecal de citocinas inflamatórias (TNF- α e IL-1 β).
5. Avaliar a ação da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) em relação a parâmetros inflamatórios como dosagem de leucócitos totais, exsudação plasmática, polimorfonucleares e mononucleares no modelo de peritonite induzido por carragenina.
6. Avaliar a ação da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) sobre a atividade da mieloperoxidase, uma medida indireta de neutrófilos, no modelo de peritonite induzida por carragenina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos Swiss de ambos os sexos, pesando entre 25-35gramas. Os animais permaneciam aclimatizados, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro, claro as 7:00 h), com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e livre acesso a água e comida. Os camundongos (machos e fêmeas) foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram aclimatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. Os experimentos foram realizados após a aprovação do protocolo (n: PP00236/2008-02/UFSC) pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), seguindo as normas éticas para o cuidado dos animais de laboratório e investigação científica da dor em animais⁵⁷. O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

3.2 Acupuntura

A estimulação do acuponto Kunlun (BL60) nos camundongos foi realizada através da inserção de agulha de acupuntura (0.18 x 8 mm) de aço inoxidável. Este acuponto está localizado nos membros posteriores, à meia distância entre o ponto mais alto do maléolo lateral e o tendão do calcâneo, sendo que, o estímulo realizado foi unilateral no membro posterior esquerdo (figura 5)⁴³. Também foi utilizado um grupo falso estimulado em um ponto sham (não acuponto) localizado na região proximal do membro posterior direito do animal (figura 6).

Os animais foram contidos para a inserção da agulha de acupuntura no ponto descrito, em um tubo cilíndrico de polietileno e, em seguida colocados separadamente em caixas acrílicas durante o período de estimulação com a agulha.

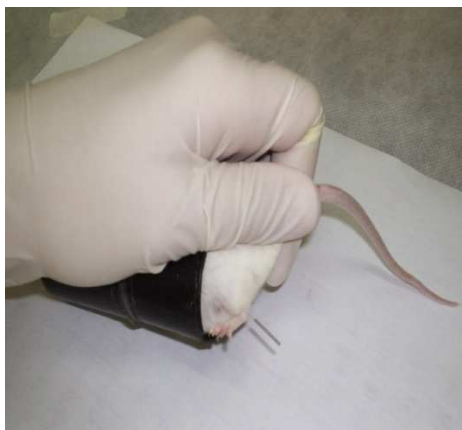


Figura 5 – Ponto Kunlun

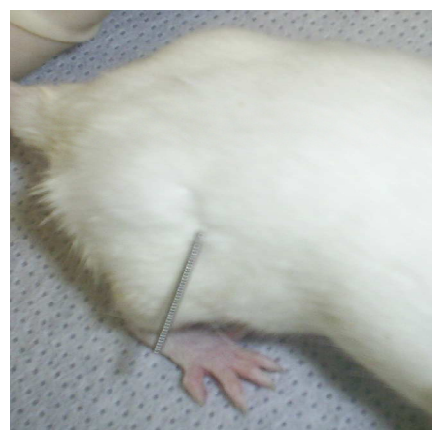


Figura 6 - Falso acuponto (Sham)

3.3 Reagentes

As seguintes substâncias foram utilizadas: ácido acético e formalina (Merck, Darmstadt, Alemanha), carragenina lambda, Interleucina 1 β , Fator de necrose tumoral- α , Complemento Adjuvante de Freud, Cetanserina, Ketamina, dexametasona (Sigma Chemical CO., St Luis, MO, EUA), cloreto de sódio (LabSynth, Diadema, Brasil). Os fármacos foram dissolvidos em solução fisiológica 0,9% de cloreto de sódio.

3.4 Modelos Experimentais de Nocicepção

3.4.1 Nocicepção Induzida por Formalina

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios)¹⁰. A metodologia utilizada foi descrita por Santos e Calixto⁵⁸. Primeiramente verificou-se o efeito da acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) no teste de nocicepção induzida pela formalina. Os animais utilizados foram individualmente ambientados em funis de vidro. Um volume de 20 μ L de solução de formalina 2,5% (0,92% formaldeído) foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita do animal, sendo individualmente observado o tempo que os animais permaneceram lambendo ou mordendo a pata injetada de 0-5 minutos (fase neurogênica) e de 15-30 minutos (fase inflamatória) após a injeção da formalina¹⁰.

Inicialmente foi avaliado o tempo de retenção da agulha. Para isto, grupos distintos de animais foram estimulados no acuponto Kunlun (BL60) (pata esquerda) por períodos de 1, 5, 10 e 30 minutos e imediatamente após a retirada da agulha, os animais foram injetados com

formalina e a resposta foi avaliada, como descrito acima. Para cada grupo tratado com acupuntura, existiu um grupo somente tratado com falso ponto (sham).

3.4.2 Nocicepção induzida por ácido acético

Depois de determinado o tempo de estimulação do acuponto, optou-se por estabelecer se haveria diferença no efeito antinociceptivo com a aplicação da agulha unilateral e bilateralmente.

Utilizou-se como modelo a nocicepção induzida pelo ácido acético. Este teste é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico¹⁰.

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de 450 µl de ácido acético (0,6%). As contorções abdominais consistem na contração da musculatura abdominal juntamente com a extensão das patas posteriores⁵⁹.

Um grupo de animal foi tratado com acupuntura no ponto Kunlun (BL60) unilateralmente, um segundo grupo foi tratado no mesmo acuponto bilateralmente e um terceiro grupo foi agulhado no não acuponto (ponto sham) antes da injeção de ácido acético. Após a injeção, os camundongos foram colocados individualmente em funis de vidro e o número de contorções abdominais foi cumulativamente quantificado durante um período de 20 min. A atividade antinociceptiva foi determinada pela inibição do número das contorções abdominais observadas nos animais tratados com acupuntura no ponto Kunlun (BL60) uni ou bilateralmente em relação aos animais agulhados com o não acuponto.

3.4.3 Alodínia mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freud (CFA)

O modelo de alodínia mecânica persistente causada pela injeção intraplantar contendo 20 µl de solução do adjuvante completo de Freud (CFA) foi utilizado para avaliar o possível efeito anti-alodínico do acuponto Kunlun (BL60).

Os camundongos foram colocados em caixas de acrílico transparente sobre uma plataforma com fundo de tela de arame durante 2 horas para a aclimatização, sendo a reatividade basal ou a alodínia mecânica avaliadas pelo contato da pata traseira com filamentos de von Frey (Stoelting, Chicago, EUA), segundo o método de *up and down*⁶⁰.

Este método foi padronizado para medir (em mg) o limiar da alodínia mecânica de cada camundongo seguindo a metodologia descrita por Chaplan et al⁶⁰. Após a aclimatização dos animais, foi utilizada uma série de filamentos de 0,008 a 6,0 g aplicados em ordem crescente ou decrescente para determinar 50% do limiar de retirada da pata (limiar 50%). O

primeiro filamento da série testado foi o de 0,4 g na pata posterior direita. Foram realizadas 6 avaliações com intervalos de 10 s. A ausência de resposta levou à utilização de outro filamento de maior massa e assim sucessivamente. Havendo retirada ou lambida da pata pelo animal, um filamento de menor massa foi aplicado após um intervalo de 2 min. O limiar de retirada da pata (50% do limiar) foi calculado de acordo com a fórmula de Dixon⁶⁰.

No dia anterior à aplicação de CFA a resposta basal de todos os animais foi avaliada. Vinte e quatro horas após a injeção do CFA verificou-se o aparecimento da alodínia mecânica e os animais foram avaliados 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas após o tratamento com a acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) ou no falso ponto (sham) (decorso temporal). Nos dias subsequentes a avaliação foi realizada 4 horas após o tratamento, sendo que no 8º e 10º dia todos os grupos foram tratados apenas com o falso ponto (sham), recebendo novamente o tratamento entre o 11º e o 13º dia.

3.4.4 Neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático

O possível efeito do tratamento com acuponto Kunlun (BL60) sobre a dor neuropática foi avaliado no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. Os animais foram previamente anestesiados e após a verificação da anestesia, foi realizada uma incisão no membro inferior direito para a exposição do nervo ciático, que foi dissecado das veias e dos tecidos aderentes de acordo com o método descrito para ratos⁶¹ e adaptado para camundongos⁶². Após o procedimento descrito, aproximadamente 1/2 a 2/3 do nervo ciático foi amarrado com o auxílio do fio de sutura (Ethicon, 7.0 Prolone, absorvível) que também foi utilizado para suturar a fáscia; já a epiderme foi suturada com o fio 4.0 (Ethicon, Mononylon, inabsorvível) (figura 7).

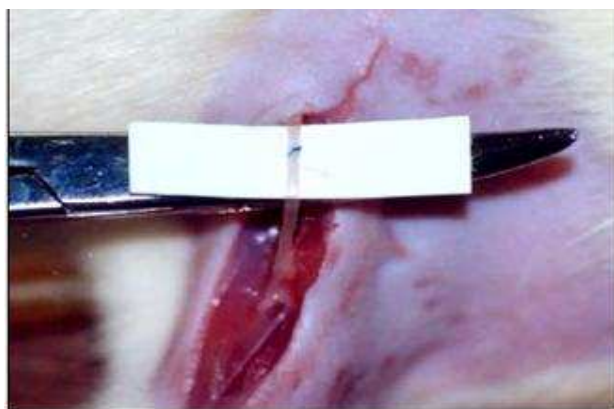


Figura 7 - Constrição parcial do nervo ciático (amarradura de aproximadamente 1/3 do nervo) – Foto: o autor

Em um grupo separado de animais, o nervo ciático foi exposto, mas não envolto com fio de sutura (falso-operados). No dia anterior à cirurgia, os animais foram submetidos ao teste de von Frey para caracterização da resposta basal e a medida foi realizada conforme descrito no item anterior (*up and down*).

Sete dias após a cirurgia, foi verificado o aparecimento da alodínia mecânica. Uma vez estabelecida alodínia, os animais foram tratados com estimulação no acuponto Kunlun (BL60) ou no falso ponto (sham) e os animais foram avaliados 0, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8 e 12 horas após o tratamento (decorso temporal). Nos dias subseqüentes, a avaliação foi realizada 2 horas após o tratamento, sendo que no 8º e 10º dia todos os grupos foram tratados apenas com o falso ponto (sham), recebendo novamente o tratamento entre o 11º e o 13º dia.

Dois grupos de animais: um operado e outro que passou pelo procedimento cirúrgico sem sofrer a constrição (grupo falso operado), foram tratados apenas com acupuntura no falso ponto (sham) e foram utilizados como parâmetro de comparação ao grupo operado e tratado com acupuntura no acuponto Kunlun (BL60).

3.4.5 Nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α

Para avaliar se a estimulação no acuponto Kunlun (BL60) possui efeito contra a nocicepção induzida por citocinas pró-inflamatórias, foram administradas as citocinas IL-1 β e TNF- α intratecalmente. O procedimento utilizado foi similar ao descrito previamente por Hylden e Wilcox⁶⁵. Os animais receberam uma injeção intratecal de 5 μ l de citocinas inflamatórias interleucina 1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral α (TNF- α), que contribuem diretamente na perpetuação da dor associada a processos inflamatórios como a hiperalgesia e alodínia^{28,64}. As administrações foram realizadas com o animal acordado, utilizando o método descrito por Hyden e Wilcox⁶⁵. Os animais foram contidos manualmente, e uma agulha adaptada a uma microseringa de 25 μ l (Hamilton) foi inserida entre as vértebras L5-L6 dentro do espaço subdural. As injeções foram administradas durante o período de 5 segundos, e a resposta nociceptiva foi avaliada após a administração de IL-1 β (citocina pró-inflamatória, agonista do receptor IL-1R tipos I e II, 1 μ g/sítio) e TNF- α (citocina pró-inflamatória, agonista do receptor TNF-R tipos I e II, 0,1 μ g/sítio). O tempo em segundos (s) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo as patas posteriores, abdômen ou cauda foi cronometrado e registrado como indicativo de nocicepção. O comportamento nociceptivo foi avaliado imediatamente após a injeção e observado por 15 minutos⁶⁵.

3.5. Modelos experimentais de inflamação

3.5.1 Modelo de peritonite aguda induzida por carragenina (Cg)

Para indução experimental da peritonite foi injetado via endovenosa a solução de Azul de Evans (25 mg/kg, 0,2 ml i.v.), para posterior determinação indireta do grau de exsudação da cavidade peritoneal⁶⁶⁻⁶⁸. Decorridos 1 hora da injeção de Azul de Evans, grupos de animais foram tratados com Acupuntura no acuponto BL60 (10 minutos), ou agulhamento no ponto sham (10 minutos) ou dexametasona (0,5 mg/kg, s.c.). Após 30 minutos do tratamento, os animais receberam intraperitonealmente 0,5 ml de solução de carragenina preparada em salina estéril (300µg/0,2ml por animal)⁶⁸ ou 0,5 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%).

Quatro horas após a administração do agente flogístico, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. A seguir, a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de solução salina heparinizada (20 UI/ml), em seguida o peritônio foi levemente massageado por 30 segundos, a seguir, os animais foram fixados em mesa cirúrgica, sendo feita uma incisão longitudinal na pele e nos músculos abdominais. O volume do líquido da cavidade peritoneal foi coletado com auxílio de pipetas automáticas e processado para posterior determinação do número total e diferencial de células e da exsudação.

A contagem total de leucócitos foi realizada utilizando-se a câmara de Neubauer espelhada e microscópio óptico (aumento de 100 vezes), com uma prévia diluição de 1:20 de líquido de Türk. Cerca de 50 µl da amostra retirada do peritônio foi acrescentada juntamente com 50 µl de solução salina dentro da cito centrífuga na qual efetua um esfregaço na lâmina, em seguida, as lâminas foram armazenadas em local adequado e secas à temperatura ambiente e corados pelo método de May-Grunwald-Giensa. A contagem diferencial (leucócitos mononucleares ou polimorfonucleares) foi realizada em microscópio óptico comum, em um aumento de 100 vezes, contando-se aproximadamente 100 células por lâmina.

Em seguida, uma alíquota de 1 ml do líquido peritoneal foi separada e congelada em freezer (-20°C) para posterior determinação dos níveis de Azul de Evans em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech – Ultrospec 2000) por leitura de densidade óptica em comprimento de onda de 600 nm. Para tal, curvas padrão com concentrações previamente conhecidas do corante também tiveram suas densidades óticas determinadas, permitindo a quantificação dos valores experimentais em µg/ml com auxílio de regressão linear.

3.5.2 Aumento da atividade da MPO, no modelo de peritonite aguda induzida por carragenina

Para dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO), uma avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos, grupos de camundongos receberam tratamento com acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) ou agulhamento no falso ponto (sham), ambos por 10 minutos, 30 minutos antes da injeção de 0,5 ml de solução fisiológica estéril (NaCl 0,9%) ou 0,5 ml de solução de carragenina preparada em salina estéril (300µg/0,2ml por animal)⁶⁸. Os animais foram sacrificados quatro horas após a injeção de carragenina, ou somente salina, sendo a cavidade peritoneal aberta e lavada com 1 ml de PBS contendo heparina (20 UI/mL). A enzima mieloperoxidase foi quantificada pela oxidação de TMB dependente de H₂O₂ através da formação de uma solução contendo 25 µl de exsudato peritoneal, 25 µl (1.6 mM) de TMB, e 100 µl (0.3 mM) de H₂O₂. A enzima mieloperoxidase foi quantificada e expressa em densidade óptica por ml de solução⁶⁹.

3.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), de uma via ou duas vias ou de medidas repetidas, dependendo do experimento, seguido pelo teste de Newman-Keuls (uma via) ou Bonferroni (duas vias), ou teste “t” não pareado de Student, quando apropriado e expressos como a média \pm E.P.M. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância. Os valores da inibição média estão representados como média geométrica acompanhada pelo seu respectivo intervalo de confiança (95%).

4 RESULTADOS

4.1 Nocicepção induzida pela formalina

Os resultados apresentados na figura 8 mostram que a estimulação prévia do acuponto B60 (Kunlun) por 5, 10 e 30 minutos reduziu significativamente tanto a fase neurogênica (0-5 minutos, figura A) quanto a fase inflamatória (15-30 minutos, figura B) da nocicepção induzida pela formalina (2,5%), com valores de inibição máxima com 10 minutos de tratamento: $61 \pm 5\%$ na fase neurogênica e 53 ± 6 na fase inflamatória. Por outro lado, os animais do grupo controle (ponto sham) não apresentaram redução na resposta induzida pela injeção de formalina. Após a realização deste experimento o tempo de 10 minutos de estimulação foi escolhido para os experimentos seguintes pela facilidade em manter a agulha no ponto durante todo o período de estimulação e pela melhor resposta apresentada.

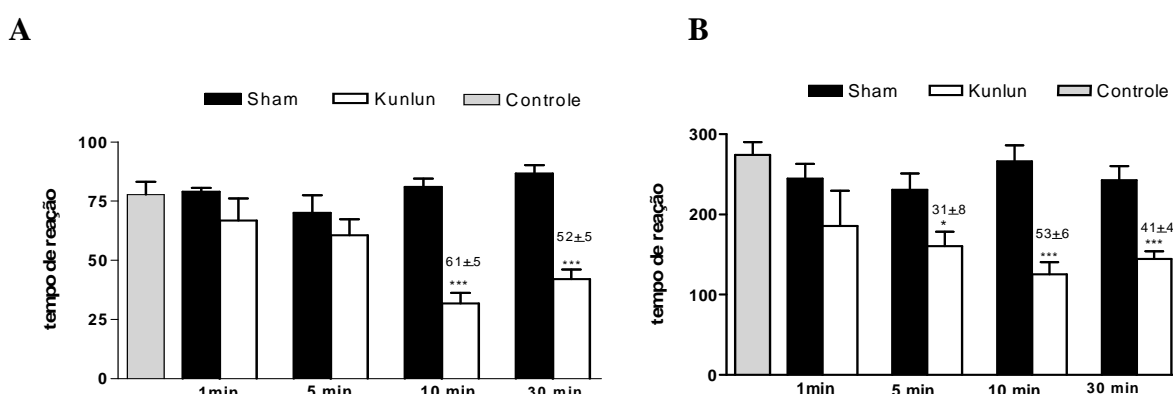


Figura 8 - Avaliação do efeito antinociceptivo da acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) no modelo de formalina (decorso temporal), com duração do estímulo de 1, 5, 10 e 30 minutos em relação à primeira fase (A) e segunda fase (B) da nocicepção induzida pela formalina (2,5%) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$, comparado ao grupo controle (falso ponto - sham), (ANOVA, seguido do teste de Newman-Keuls).

4.2 Nocicepção induzida pelo ácido acético e comparação entre o tratamento unilateral e bilateral

Os resultados apresentados na figura 9 mostram que a estimulação do acuponto B60 (kunlun) produziu uma inibição significativa, tanto no tratamento uni quanto bilateral, no número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, comparados ao grupo tratado com o falso ponto (sham), com valores de $48 \pm 3\%$ no tratamento

unilateral e $46 \pm 6\%$ no tratamento bilateral. Não foi observada diferença estatística entre a inibição do tratamento unilateral e bilateral.

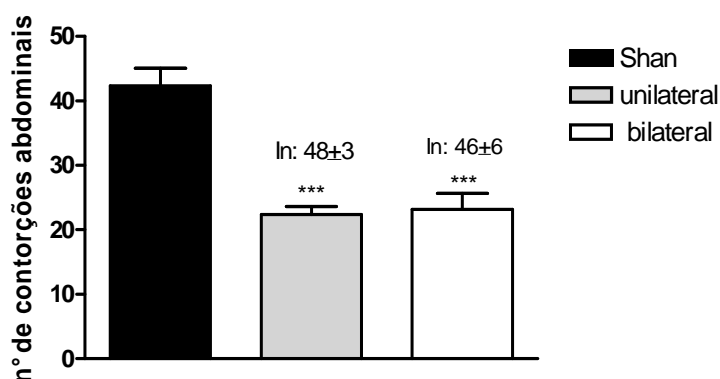


Figura 9 - Comparação entre a atividade antinociceptiva do acuponto Kunlun (BL60), uni ou bilateral, na nocicepção induzida por ácido acético 0,6% (450 µl, i.p.) em camundongos. Cada grupo representa a média de 6 a 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$, comparado ao grupo sham (falso ponto), (pelo teste Student de Newman-Keuls).

4.3 Neuropatia induzida pela contração parcial do nervo ciático

O tratamento agudo com estimulação no acuponto B60 (kunlun) diminuiu significativamente a alodínia mecânica avaliada através do filamento de Von Frey na pata dos animais operados, sendo que seu efeito ocorreu a partir dos primeiros 30 minutos (inibição de $52 \pm 7\%$), e foi mais intenso 2 horas (inibição de $73 \pm 7\%$) após o tratamento com o acuponto Kunlun por 10 minutos e permaneceu de forma significativa por até 6 horas (Fig. 10).

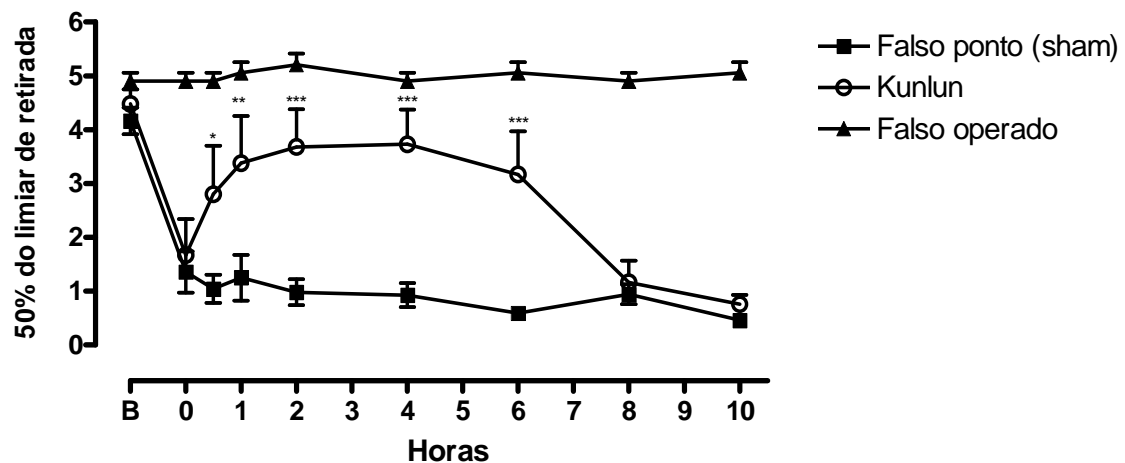


Figura 10 – Decurso temporal do efeito do tratamento com o acuponto Kunlun (BL60) na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. (■) representa o grupo operado que recebeu estimulação em um falso ponto (sham); (○) representa o grupo operado e submetido ao tratamento com estimulação no acuponto Kunlun e (▲) representa o grupo falso operado que recebeu apenas estimulação no falso ponto (sham); O grupo identificado como B representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia. Cada grupo representam à média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$, comparado ao grupo operado e agulhado no falso ponto. (pelo teste ANOVA de 2 vias).

Quando administrada diariamente, a estimulação no acuponto Kunlun (BL60) por 10 minutos demonstrou ser efetiva em reduzir a alodínia mecânica avaliada 2 h, após o tratamento. A acupuntura realizada uma vez ao dia, durante 7 dias, reduziu significativamente a alodínea mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático. Esse efeito foi evidente até o 7º dia de tratamento. Todavia, quando o tratamento foi suspenso por 3 dias, a alodínea mecânica foi restabelecida. No 11º dia, o tratamento dos animais com acupuntura foi reiniciado e observou-se que a mesma foi capaz de reduzir a alodínea mecânica semelhante ao tratamento agudo (figura 11).

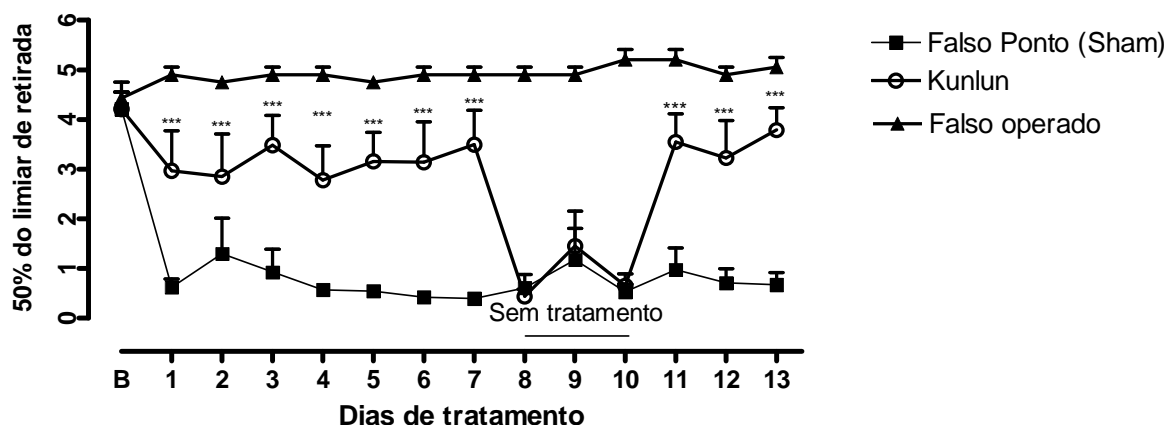


Figura 11 - Efeito do agulhamento no acuponto Kunlun por 10 minutos, 2 horas após o tratamento diário, na neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático em camundongos. (■) representa o grupo operado que recebeu agulhamento no falso ponto (sham); (○) representa o grupo operado e submetido ao tratamento com acupuntura no acuponto Kunlun por 10 minutos; (▲) representa o grupo sham que recebeu agulhamento no falso ponto (sham). O grupo identificado como B representa o limiar dos animais antes de serem submetidos à cirurgia. Cada grupo representa a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparado ao grupo operado e que recebeu o falso ponto (sham) (pelo teste ANOVA de 2 vias).

4.4 Alodínia mecânica induzida pelo Adjuvante Completo de Freud (CFA)

A injeção intraplantar de CFA foi capaz de induzir alodínia mecânica na pata de camundongos 24 horas após a aplicação deste agente inflamatório, com redução do limiar 50 % de retirada (Figura 12).

O tratamento agudo com acupuntura no acuponto B60 por 10 minutos diminuiu significativamente a alodínia mecânica avaliada através do filamento de von Frey na pata dos animais que receberam CFA, sendo que seu efeito foi mais intenso 4 horas (inibição de $63 \pm 4\%$) após a sua administração (decorso temporal). (Fig. 12)

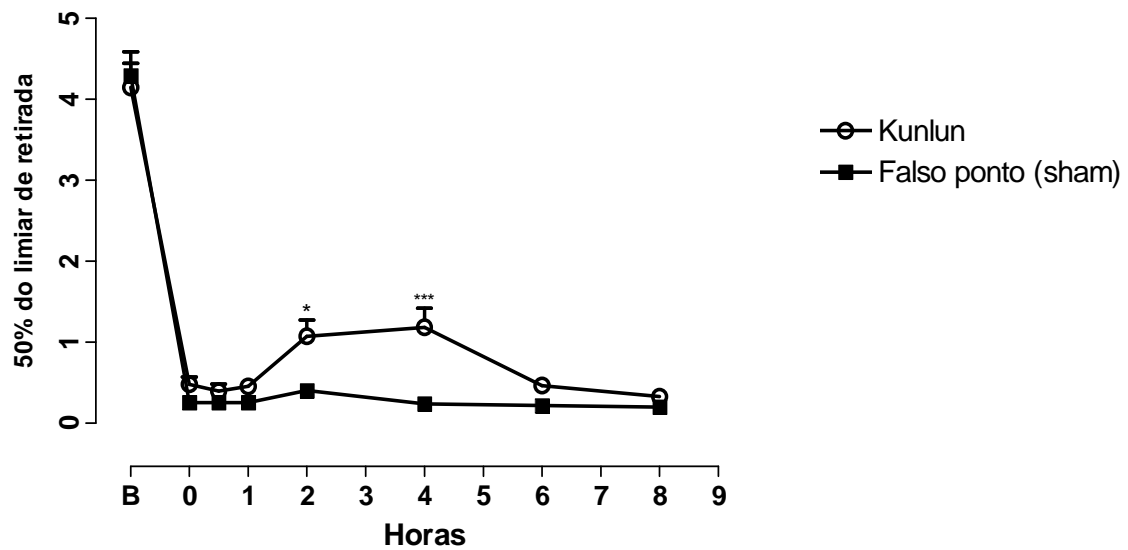


Figura 12 - Efeito da estimulação do acuponto Kunlun (BL60) sobre a alodínia mecânica induzida pela injeção intraplantar de CFA em camundongos. B representa o limiar dos animais antes de receberem o CFA. Cada grupo representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo tratado com falso ponto (sham) (pelo teste ANOVA).

Quando administrada diariamente, a estimulação no acuponto Kunlun (BL60) por 10 minutos demonstrou ser efetiva em reduzir a alodínia mecânica avaliada 4 h, após o tratamento. A acupuntura realizada uma vez ao dia, durante 7 dias, reduziu significativamente a alodínea mecânica induzida pela constrição parcial do nervo ciático. Esse efeito foi evidente até o 7º dia de tratamento. Todavia, quando o tratamento foi suspenso por 3 dias, a alodínea mecânica foi restabelecida. No 11º dia, o tratamento dos animais com acupuntura foi reiniciado e observou-se que a mesma foi capaz de reduzir a alodínea mecânica semelhante ao tratamento agudo (figura 13).

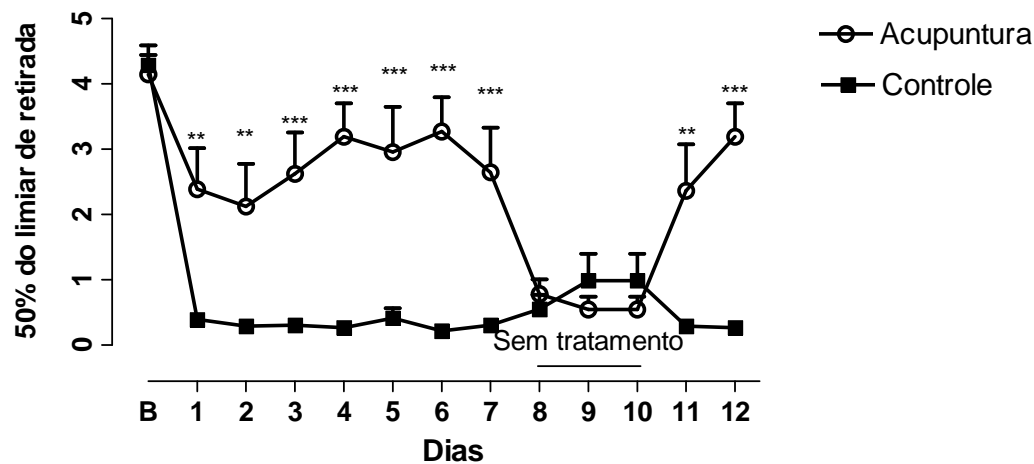


Figura 13 - Efeito da estimulação do acuponto Kunlun (B60) 4 horas após o tratamento diário, na alodínia induzida pela injeção de CFA. (■) representa o grupo que recebeu CFA e agulhamento em um falso ponto (sham); (○) representa o grupo que recebeu CFA e foi submetido ao tratamento com agulhamento no acuponto Kunlun. O grupo identificado como B representa o limiar dos animais antes de receberem a injeção. Cada grupo representam a média de 8 animais e as linhas verticais indicam o E.P.M. Os símbolos indicam o nível de significância: ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ comparado ao grupo tratado com o falso ponto (sham) (pelo teste ANOVA).

4.5 Nocicepção induzida pela injeção intratecal de IL-1 β e TNF- α

A figura 14 mostra o efeito nociceptivo induzido pela administração intratecal de IL-1 β (1 $\mu\text{g/sítio}$) e TNF- α (0,1 $\mu\text{g/sítio}$). O tratamento com estimulação no acuponto Kunlun (BL60) por 10 minutos foi capaz de reduzir de forma significativa a nocicepção causada pelo TNF- α e pela IL-1 β com inibição de 97 ± 3 e 65 ± 4 , respectivamente.

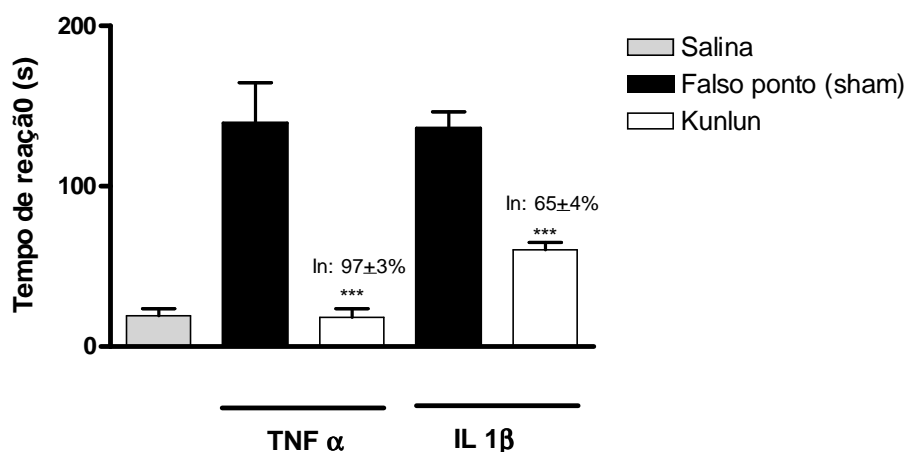


Figura 14 - Efeito antinociceptivo do tratamento com o acuponto Kunlun, em relação a nocicepção induzida pela injeção intratecal de TNF- α e IL-1 β , em camundongos. Os animais foram tratados com acupuntura no acuponto Kunlun (10 minutos) ou receberam apenas agulhamento num falso ponto (sham), 2 horas antes, e após a nocicepção foi avaliada. Cada grupo representa a média de 8 animais e as barras verticais o E.P.M.. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparado ao que recebeu o falso ponto(sham) (pelo teste “t” Anova).

4.6 Peritonite induzida por carragenina

Os resultados apresentados nas figuras 14 a 18 demonstram que o tratamento dos animais com acupuntura no acuponto Kunlun por 10 minutos foi capaz de inibir a primeira fase do processo inflamatório (4 horas) da cavidade peritoneal induzida pela injeção intraperitoneal de 0,5 ml de solução de carragenina preparada em salina estéril (300 μ g/0,2ml por animal). É possível observar que a acupuntura causou uma redução da migração celular (número de leucócitos totais) para a cavidade peritoneal (figura 15A), com inibição de 71 \pm 7% semelhante à inibição causada pela dexametasona (controle positivo). Esta redução foi representada principalmente por uma diminuição na migração de polimorfonucleares (figura 15 B) com inibição de 89 \pm 2%, resultado este semelhante ao o controle positivo, dexametasona, um antiinflamatório, muito usado na clínica. Contudo, a estimulação do acuponto Kunlun (BL60) não foi capaz de reduzir a exsudação plasmática induzida pela carragenina (figura 15 C), e a migração de mononucleares (figura 15 D), resultado diferente do controle positivo dexametasona, que foi capaz de inibir a exsudação plasmática para o sítio inflamatório.

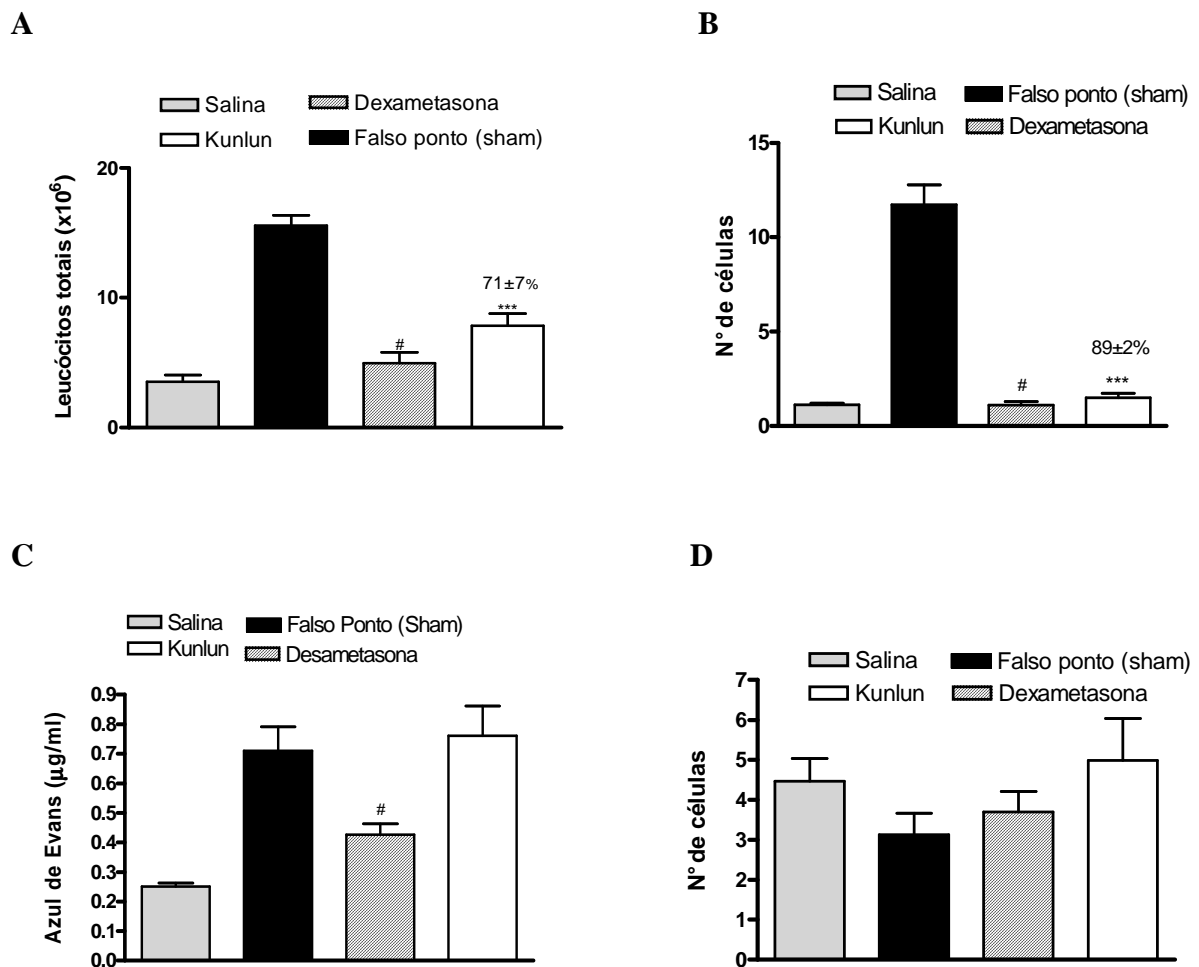


Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com acupuntura no acuponto kunlun por 10 minutos, na peritonite induzida pela carragenina em camundongos. Os leucócitos totais (A), o número de polimorfonucleares (B), o extravasamento de azul de Evans (C) e o número de mononucleares (D) foram medidos 4 horas após a administração intraperitoneal de carragenina na presença e na ausência do tratamento com a acupuntura. Cada coluna representa a média de 6-12 animais e as barras verticais o E.P.M.. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle tratado com carragenina e que recebeu o falso ponto(sham) e # $p < 0,001$ comparando o controle positivo ao grupo que recebeu carragenina e tratado com o falso ponto (sham) (ambos pelo teste “t” ANOVA)

4.7 Efeito sobre o aumento da atividade da MPO induzido pela Carragenina

A injeção de 0,5 ml de solução de carragenina (300 $\mu\text{g}/0,2\text{ml}$) aumentou em cerca de 4 vezes a atividade da mieloperoxidase (MPO), uma avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos, quando comparado com os valores de animais tratados apenas com salina. O pré-tratamento com acupuntura no acuponto Kunlun durante 10 minutos, 4 horas antes da injeção de carragenina, reduziu significativamente a atividade da enzima MPO (In: 81 \pm 12 %).

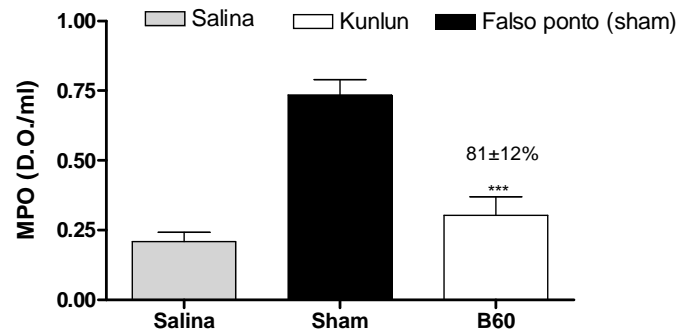


Figura 16 - Efeito do tratamento da acupuntura no acuponto Kunlun durante 10 minutos sobre o aumento da atividade da MPO, induzido pela injeção intraplantar de Cg em camundongos. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 6- 8 animais. A análise estatística foi feita comparando todos os grupos experimentais utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste Student-Newman Keuls. Os símbolos indicam o nível de significância: *** $p < 0,001$ comparado ao grupo controle tratado com carragenina e que recebeu o falso ponto(sham).

5 DISCUSSÃO

A acupuntura, apesar de ser reconhecida como especialidade médica no Brasil há mais de 10 anos, ainda gera discussões com relação à comprovação de sua eficácia baseada em dados científicos. Ainda assim, a acupuntura é um grande aliado no combate à dor sendo usada também, no tratamento da náusea pós-operatória, acesso de vômitos, asma, acidente vascular encefálico e abuso de drogas, muito embora a população possa ser dividida em responsivos e não responsivos ao tratamento com agulhas, tal como os animais de laboratório^{44,46,55}.

O acuponto Kunlun é amplamente utilizado na prática clínica para tratamento da dor, principalmente no que concerne as dores crônicas⁵⁵. Emmel⁴³ demonstrou a antinocicepção do acuponto kunlun (BL60), isoladamente, no modelo de nocicepção induzido pelo ácido acético, assim como o envolvimento do sistema opióide e serotoninérgico na nocicepção desse acuponto. Nosso trabalho busca avançar os conhecimentos sobre as ações que envolvem a acupuntura. O primeiro passo deste estudo foi verificar se o efeito da estimulação com o acuponto kunlun (BL60) era de origem predominantemente neurogênica ou inflamatória. Além de avaliar se o tempo em que a agulha permanece retida no ponto induz diferenças quantitativas ou tempo-dependentes nesta ação.

Desta forma, testou-se a acupuntura no modelo de nocicepção induzida pela formalina (2,5%). A formalina é um modelo com características individuais, que induz nocicepção em dois momentos, chamados fase neurogênica e fase inflamatória. A dor neurogênica (0 a 5 minutos), característica da primeira fase deste teste é causada após a ativação direta dos nociceptores periféricos, como fibras C e A δ ^{70,71} e produz um comportamento característico, padronizado como indicativo de dor⁷². A dor inflamatória (15 a 30 minutos) se dá após a liberação de alguns mediadores, causando uma facilitação sensorial e uma sensibilização central da medula espinhal^{72,73}. Após a injeção de formalina, os nociceptores são caracteristicamente sensibilizados e ativados por mediadores como aminoácidos excitatórios (glutamato), prostaglandinas, taquicininas, óxido nítrico e outros peptídeos^{58,62,72}.

Neste sentido, no presente estudo, foi demonstrado, que a estimulação do acuponto Kunlun (BL60) foi capaz de reduzir de forma significativa, ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina (Fig. 8, A e B), sendo que este efeito inicia-se a partir de 10 minutos

com agulha para inibição da fase neurogênica e com 5 minutos de agulha para fase inflamatória, com ação máxima com 10 minutos de estímulo em ambas as fases.

O efeito do tratamento com o acuponto kunlun neste modelo foi semelhante aos resultados encontrados por Kim e Kwon e colaboradores^{51,74}, com a utilização de veneno de abelha nos pontos de acupuntura Zhongwan (CV12) e Zusanli (ST36) inibiu o comportamento nociceptivo nos modelos de nocicepção induzida por ácido acético e formalina em ratos e camundongos. Estes estudos somam-se aos de Li e colaboradores⁷⁵, que utilizaram eletroacupuntura nos pontos BL60 (Kunlun) e ST36 (Suzanli) e observaram um efeito antinociceptivo em camundongos. A inibição na primeira fase da formalina (neurogênica) confirma os achados da acupuntura na prática clínica, pois interessante, pacientes com sintomas de dor obtêm um alívio imediatamente após a sessão de acupuntura indicando um possível mecanismo de ação ligado a reflexos axonais mediados por receptores polimodais⁷⁶.

Geralmente, os trabalhos publicados com acupuntura manual utilizam apenas um tempo de estimulação pré-estabelecido^{40,77}, neste sentido, no presente estudo procurou-se também analisar qual o melhor tempo de retenção da agulha no acuponto, bem como a duração deste efeito após a retirada da agulha. Além disso, para cada grupo punturado no acuponto Kunlun, foi analisado um grupo punturado em um falso ponto (sham). Assim, foi possível observar e conseqüentemente descartar que a antinocicepção causada pela estimulação do acuponto fosse decorrente apenas do stress causado pelo agulhamento.

Na prática clínica, os pontos periféricos são usados bilateralmente. Neste estudo foi analisado se haveria diferença na inserção unilateral ou bilateral da agulha de acupuntura no acuponto estudado. Essa verificação foi feita utilizando-se o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, que é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral, sendo amplamente utilizado como ferramenta para detecção e avaliação de agentes com propriedades analgésicas e antiinflamatórias^{59,78}. Os prótons oriundos da dissociação do ácido acético podem ativar diretamente canais de cátions não seletivos localizados nas vias aferentes primárias⁵. No presente estudo foi demonstrado, que a estimulação do acuponto BL60 (Kunlun) foi capaz de reduzir de forma significativa as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, entretanto não apresentou diferença significativa entre o agulhamento unilateral e bilateral com inibição de $48 \pm 3\%$ e $46 \pm 6\%$, respectivamente.

Em outra etapa do nosso estudo, buscou-se analisar o possível efeito antinociceptivo da estimulação do acuponto Kunlun na dor crônica de origem neuropática. A dor crônica é uma condição que freqüentemente é debilitante. Atualmente, poucas drogas são efetivas no

tratamento desse distúrbio e muitas apresentam importantes efeitos colaterais^{34,79,80}. A busca de novas terapias no manejo da dor crônica tem-se mostrado essencial. Em nosso estudo foi demonstrado que a estimulação com o acuponto Kunlun (BL60) por 10 minutos produz inibição na alodínea tátil induzida por dois modelos de dor crônica: constrição parcial do nervo ciático e modelo químico induzido por administração de CFA em camundongos. Desta forma, a estimulação do acuponto Kunlun (BL60) foi analisado nos animais submetidos à ligadura parcial do nervo ciático, tendo em vista que este modelo experimental simula sintomas observados em pacientes com neuropatia periférica, como a ciatalgia, sendo extensivamente aplicado na pesquisa comportamental⁶⁹.

Na nocicepção crônica, induzida pela constrição parcial do nervo ciático, a estimulação do acuponto Kunlun (BL60) mostrou-se efetiva em reduzir a alodínea mecânica, sem, no entanto, gerar tolerância.

Dados da literatura remetem para a importância da acupuntura no tratamento complementar para dores crônicas. A dor crônica é o principal motivo que leva cerca de um milhão de norte-americanos, por ano, a procurarem a acupuntura⁸¹. Médicos alemães, procurando obter evidências práticas de resultados obtidos com o uso de acupuntura na clínica médica, observaram mais de 14.000 sujeitos com dores crônicas em região cervical e constataram que aqueles submetidos a sessões de acupuntura (15 sessões) aliadas ao tratamento comum nos hospitais e clínicas apresentavam melhora na dor significativamente maior que os pacientes submetidos apenas ao tratamento convencional.⁸⁰

Remy et al⁸² ao avaliar 74 pacientes com diagnóstico de enxaqueca, observou que os pacientes submetidos a acupuntura em associação com medicamentos, relataram maior diminuição das dores de cabeça e melhora na qualidade de vida que os pacientes tratados apenas com medicamentos.

As sensações de dor estão normalmente relacionadas à ativação de neurônios aferentes primários não mielinizados (fibras C) ou pouco mielinizados (fibras Aδ), que são normalmente silenciosos na ausência de estimulação, e respondem melhor aos estímulos que são potencialmente nocivos. Entretanto, após a lesão no nervo periférico, estes neurônios tornam-se anormalmente sensíveis e desenvolvem atividade espontânea patológica²⁹.

Partindo disso, diversos modelos tentam explicar os possíveis mecanismos de ação para a analgesia acupuntural, sendo conhecido um modelo neuro-humoral, onde a agulha de acupuntura estimula os aferentes Aδ que terminam no corno dorsal da medula espinhal, transfere o impulso a um segundo neurônio dentro do mesmo segmento espinhal, ativando três níveis do sistema nervoso. Em ordem ascendente estes níveis são: medula espinhal dentro

do mesmo segmento, região supra-espinhal – substância cinzenta periaquedutal, núcleo magno da rafe e o complexo hipófise-hipotálamo. Quando cada um destes níveis é estimulado, endorfinas específicas e monoaminas, serotonina e adrenalina tornam-se envolvidas em uma cascata química que inibe a dor^{41,44}.

Segundo outros estudos, o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF, glial cell line-derived neurotrophic factor) tem papel importante na modulação da nocicepção da dor neuropática. Em modelo de dor neuropática induzida por constrição crônica do nervo ciático em ratos, verifica-se⁸³ que ocorre aumento na expressão, tanto da proteína quanto do RNAm, de GDNF e seu receptor (GFRa-1) no gânglio da raiz dorsal e no corno dorsal da medula espinal. O aumento foi ainda maior nos animais tratados com eletroacupuntura, indicando possível papel deste fator endógeno na analgesia induzida por tratamento com eletroacupuntura⁸³.

No modelo de nocicepção inflamatória crônica induzida por Adjuvante Completo de Freud (CFA), uma potente agente que produz inflamação tecidual, tem sido experimentalmente utilizada como um modelo de dor inflamatória periférica em animais como ratos e camundongos, simulando um tipo de doença inflamatória periférica. A injeção na pata do animal produz uma inflamação severa local com hiperemia e edema restrito a pata.

No teste da inflamação crônica (CFA), a estimulação do acuponto Kunlun (BL60) mostrou-se efetivo em reduzir a alodínea mecânica, sem, no entanto, gerar tolerância.

Um considerável número de trabalhos tem mostrado o efeito da acupuntura na alodínea produzida pela injeção de CFA^{42,75,84}. Li e colaboradores⁷⁵ observou o efeito antinociceptivo e antiedema da eletroacupuntura nos acupontos Kunlun (BL60) e Zusanli (ST36), Li Aihui⁸⁴ também observou o efeito antiedema da eletroacupuntura^{85,86}. Cha⁵⁶, trabalhou com agulhamento dos acupontos Zusanli (ST36) e Yinlingquan (SP9) e observou efeito antinociceptivo na alodínia mecânica e térmica, induzido por dor neuropática.

Li e colaboradores⁷⁵, comparou 4 diferentes acupontos e seus efeitos antinociceptivos, e concluiu que o Zusanli (ST36) e o Kunlun (B60) foram capazes de reverter a alodínia térmica induzida pela injeção de CFA; todavia os acupontos sham (falso ponto), Shousanli (LI 10) e Neiguan (PC 6) não foram capazes de provocar efeito antinociceptivo, confirmando os dados apresentados neste estudo. Uma das hipóteses para explicar a dor inflamatória crônica induzida por injeção intraplantar de CFA, baseia-se na liberação de mediadores nociceptivos e citocinas pró-inflamatórias, que sensibilizam neurônios e participam do processo de perpetuação da dor. A sensibilização neuronal das fibras dos aferentes primários por citocinas inflamatórias como a IL-1 β e TNF- α depois da lesão ao nervo, parece ser mediada por uma

complexa cascata inflamatória que envolve outras substâncias como óxido nítrico, bradicinina e Prostaglandina E_2 ^{69, 86}.

Uma vez confirmada a atividade da acupuntura no acuponto Kunlun com a dor crônica e tendo em vista o envolvimento de citocinas inflamatórias nesse processo, decidiu-se investigar o possível envolvimento da acupuntura na dor induzida por citocinas pró-inflamatórias. A estimulação do acuponto Kunlun inibiu a nocicepção induzidas por estas citocinas, sugerindo que esta estimulação pode ter um envolvimento significativo em processos de dores crônicas inflamatórias, visto que IL-1 β e TNF- α participam ativamente de processos inflamatórios e da transmissão nociceptiva²⁷. A citocina inflamatória IL-1 β é produzida e secretada sobre condições patológicas associadas a neuropatias, crescimento tumoral e doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide⁸⁷.

O TNF- α é considerado uma citocina inflamatória protótipo, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 β , IL-16 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da cicloxigenase-2 (COX-2)⁸⁷. A IL-1 β e TNF- α são produzidos e liberados durante a inflamação periférica e também, nas mesmas condições, são liberados por células presentes no SNC, como células de Schwann e pela glia⁸⁷. Os resultados encontrados neste trabalho nos fornecem subsídios, indicando que a estimulação do acuponto Kunlun (BL60), possa estar interferindo direta ou indiretamente com a ação de citocinas, ou ainda, estar inibindo a resposta nociceptiva desencadeada pela IL-1 β e TNF- α .

Apesar de ser um acuponto usado na clínica para analgesia, optou-se por investigar um possível efeito antiinflamatório do acuponto kunlun (BL60), visto que, não existe nenhum trabalho relacionando esse acuponto com tal efeito. Para análise do efeito antiinflamatório optou-se por utilizar o modelo da carragenina, uma mistura de polissacarídeos derivados de algas marinhas, sendo um dos irritantes não específicos mais amplamente utilizados para a indução e o estudo da inflamação e para o desenvolvimento de drogas com ação antiinflamatória.

Trabalhos descritos anteriormente⁸⁸, demonstraram que a administração de carragenina na cavidade pleural de camundongos induz uma resposta inflamatória, bifásica, com aumento significativo, tanto no número total de células, quando na exsudação. Dessa forma, foi determinado que este padrão de resposta é precedido por duas fases, sendo uma precoce (primeira fase) e outra tardia (segunda fase) da resposta inflamatória induzida pela carragenina em camundongos. Além disso, foi observado que a administração de carragenina na cavidade peritoneal promoveu um aumento gradual do número total leucócitos,

principalmente de neutrófilos. Paralelamente, também foi observado um aumento da exsudação, avaliada pelo extravasamento de azul de Evans na cavidade peritoneal.

Desse modo, a carragenina tem sido o agente irritante mais utilizado para o estudo do processo inflamatório na cavidade peritoneal, principalmente por induzir intensa reação inflamatória⁸⁸. O pré-tratamento dos animais com dexametasona (composto antiinflamatório conhecido e usado no presente estudo com controle positivo) foi capaz de inibir de forma significativa a resposta inflamatória induzida pela carragenina. Os nossos resultados demonstram, pela primeira vez, que o estímulo do acuponto Kunlun (BL60) é capaz de inibir de forma significativa, o influxo de leucócitos, principalmente de neutrófilos, para a cavidade peritoneal, de forma muito semelhante aos valores encontrados para o tratamento com dexametasona (controle positivo). A acupuntura, no entanto, não interferiu na exsudação e nem na atividade mononuclear.

Na fase inicial do processo inflamatório, os neutrófilos são reconhecidamente um dos principais componentes celulares presentes no sítio inflamatório. Estas células podem migrar para o sítio inflamatório e liberar enzimas proteolíticas, espécies reativas de oxigênio e outros mediadores pró-inflamatórios²⁶. A atividade da mieloperoxidase é um marcador indireto da atividade neutrofílica implicada na migração celular, associada ao óxido nítrico⁶⁶. O aumento da MPO é um importante indicativo da progressão do processo inflamatório. O estímulo com o acuponto Kunlun (BL60) foi capaz de reduzir intensamente a atividade da mieloperoxidase. Associado aos dados anteriores, pode-se propor que um dos mecanismos que justifica a atividade antiinflamatória do acuponto Kunlun (BL60) é a inibição do influxo de neutrófilos para o sítio inflamatório. Não existem trabalhos na literatura relacionando o acuponto Kunlun (BL60) e uma possível ação antiinflamatória, todavia, existe uma vasta gama de artigos corroborando em modelos *in vivo* e *in vitro*, a ação antiinflamatória da acupuntura^{67,75,84}. Em diversos modelos inflamatórios, a acupuntura reduz o número de leucócitos e o volume do exsudato. No modelo de peritonite induzida por carragenina, a concentração de interleucina 10 (IL-10) foi inibida pelo tratamento com acupuntura nos pontos extras Bai Hui, Ho Hai e Yin Tang em ratos⁴⁰. Kim e colaboradores⁶⁷ apresentaram o efeito antiinflamatório do acuponto Zusanli e seu provável envolvimento com os glicocorticóides liberados pela adrenal. Li e colaboradores⁸⁴ demonstraram envolvimento do acuponto Huantiao (GB30) no aumento da liberação de CRH pelos neurônios do núcleo paraventricular. É interessante ressaltar que os acupontos relacionados, já são usados como pontos antiinflamatórios na Acupuntura Clínica, confirmando observação empírica.

O modelo de inflamação, induzido pela injeção intraperitoneal de carragenina, é considerado um importante teste para pesquisa de possíveis fármacos antiinflamatórios. Assim, os nossos dados mostram pela primeira vez que o acuponto Kunlun (BL60) possui ação antiinflamatória neste modelo, todavia, estudos adicionais devem ser realizados com a finalidade de caracterizar de forma mais detalhada os mecanismos envolvidos neste efeito. Do mesmo modo, é interessante a realização de estudos posteriores a elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva crônica da acupuntura no acuponto Kunlun (BL60).

Neste contexto, os resultados obtidos neste estudo nos fornecem evidências fisiológica, bioquímica e farmacológica para justificar a eficácia do acuponto Kunlun na clínica, validando seu potencial terapêutico analgésico e antiinflamatório, como monoterapia ou em associação com outras terapias.

6 CONCLUSÕES

- A acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) apresentou efeito antinociceptivo nas duas fases da nocicepção causada pela formalina
- A estimulação de um ponto sham não foi capaz de provocar efeito antinociceptivo e antiinflamatório nos modelos de nocicepção e inflamação avaliados.
- Não houve diferença entre o tratamento uni ou bilateral na antinocicepção observada no modelo do ácido acético.
- A acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) é eficaz em inibir a alodínia mecânica no modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial do nervo ciático e no modelo de dor crônica inflamatória induzida pelo Adjuvante Completo de Freud (CFA)
- O tratamento com o acuponto Kunlun (BL60) é capaz de inibir o efeito pró-nociceptivo das citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α administradas pela via intratecal em camundongos
- Foi demonstrado que o acuponto kunlun (BL60) apresentou atividade antiinflamatória parcial o modelo de peritonite, porém os mecanismos envolvidos neste efeito não foram possíveis de ser esclarecidos no presente estudo.

REFERÊNCIAS

1. Champman CR, Gravin J. Suffering: the contributions of persistent pain. *Lancet*. 1999;353:2233-3237
2. Millan MJ. The introduction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol*. 1999; 57:1-164
3. Woolf CJ. Pain. *Neurobiol. Dis*. 2000; 7: 504-10
4. Almeida TF, Roizenblatt S, Tufik S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Re*. 2004; 1000:40-56
5. Julius D, Basbaum AI. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 2001; 413:203-10
6. Griffis CA, Compton P, Doering L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. *Bio Res Nurs*. 2006;7: 297-312
7. Daut AW, Hadlich E, Facin MA, Aprato RMS, Pereira RP. Opióides no manejo da dor – uso correto ou subestimado? Dados de um hospital universitário. *Rev Ass Med Brasil*. 1998; 44(2): 106-10
8. Holtz VV, Stechman JN. Epidemiologia da dor em pacientes de Curitiba e região metropolitana. *Rev Dor*. 2008; 9: 1217-24
9. Pedroso RA, Celich KLS. Dor: quinto sinal vital, um desafio para o cuidar em enfermagem. [trabalho de conclusão de curso]. Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões, curso de enfermagem; 2006.
10. Tjolsen A, Hole K. Animal models of analgesia. In: Dickenson A, Besson J, editors. *The Pharmacology of pain*. Berlin: Springer; 1997. p. 1-20.
11. Burgess PR, Perl ER. Myelinated afferent fibers responding specifically to noxious stimulation of the skin. *Journal Physiol*. 1967; 190: 541-62.
12. Carlton SM, Zhou S, Coggeshall RE. Evidence for the interaction of glutamate and NK1 receptors in the periphery. *Brain Res*. 1998; 790: 160-69.
13. Pasero C, Paice J, McCaffery M. Basic mechanisms underlying the causes and effects of pain. In: McCaffery J and Pasero C, editors. *Pain Clinical Manual*. St Louis; Mosby; 1999. p. 15-34.
14. Wall PD, Melzack R. *Textbook of pain*. Londres: Churchill Livingstone; 1999. p. 1-8.
15. Besson MJ, Dickenson A. *The pharmacology of pain*. Berlin: Springer-Verlag. 1997; 130: 21-41.

16. Hunt SP, Koltzenburg M. The neurobiology of pain : (molecular and cellular neurobiology). Oxford: Oxford University Press, 2005.
17. Pleuvry BJ, Lauretti GR. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment *Pharmacol Ther.* 1996; 71: 313-24.
18. Hunt SP, Mantyh PW. The molecular dynamics of pain control. *Nat Rev Neurosci.* 2001; 2(2):83-91.
19. Levine JD, Reichling DB. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. In: Wall PD, Melzack R, editors. *Textbook of pain*, 4 ed. Londres: Churchill Livingstone; 1999. p. 59-84.
20. Kalant H, Roschlau WHC. *Princípios de farmacologia médica*. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1999. p. 245-51.
21. Fantone JC, Ward PA. Inflamação. In: Rubin E, Farber JL, editors. *Patologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1990. p. 34-58.
22. Rocha e Silva MO. Brief history of inflammation. In: Vane JR, Ferreira SH. *Handbook of Experimental Pharmacology*. New York: Springer-Verlag; 1978. p. 6-25.
23. Cotran R, Kumar Z, Robbins SL. *Robins: Patologia Clínica*, 7º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 33-72.
24. Brasilério Filho G, et al. *Bogliolo Patologia*. 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2000 p. 110-143.
25. Aderem A, Smith KD. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. *Sem Immunol.* 2004; 16: 55-67.
26. Gilroy DW, Lawrence T, Perretti M, Rossi AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. *Nat Rev.* 2004; 3: 104-06.
27. Vanegas H. To descending pain-control system in rats, inflammation induced primary and secondary hyperalgesia are two different things. *Neuros. Letters.* 2004; 361: 225-28.
28. Coutaux A, Adam F, Willer JC, Le Bars D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. *Joint Bone Spine.* 2005; 72: 359-71.
29. Baron R. Mechanisms of Disease: neuropathic pain - a clinical perspective. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006; 2: 95-106.
30. Finnerup NB, Jensen TS. Spinal cord injury pain-mechanisms and treatment. *Eur J Neurol.* 2004; 11: 73-82.
31. Woolf C.J. Dissecting out mechanisms responsible for peripheral neuropathic pain: implications for diagnosis and therapy. *Life Sci.* 2004; 74: 2605-10.
- 32.Coderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R. Contribution of central neuroplasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. *Pain.* 1993;52:259-285.

33. Larrea LG, Peyron R. Motor cortex stimulation for neuropathic: from phenomenology to mechanisms. *Neuroimage*. 2007; 37:71-9.
34. Dellaroza MSG, Furuya RK, Cabrera MAS, Matsuo T, Yamada K, Pacola L. Caracterização da dor crônica e métodos analgésicos utilizados por idosos na comunidade. *Rev Assoc Med Bras*. 2008; 54(1): 36-41.
35. Teixeira MJ, Teixeira WGJ, Santos FPS. Epidemiologia clínica do dor músculo-esquelética. *Rev Med São Paulo*. 2001;80:1-21.
36. Tandrup T, Woolf CJ, Coggeshall RE. Delayed loss of small dorsal root ganglion cells after transaction of the rat sciatic nerve. *J Comp Neurol*. 2000; 422:172-180.
37. Herrero JF, Laird JMA, Lopez-Garcia JA. Wind-up of spinal cord neurones and pain sensation: much ado about something? *Prog Neurobiol*. 2000; 61: 169-203.
38. Moalem G, Tracey DJ. Immune and inflammatory mechanisms in neuropathic pain. *Brain Res Brain Res Rev*. 2005; 51:240-264.
39. UEDA H. Molecular mechanisms of neuropathic pain—phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2006; 109: 57–77.
40. Scognamillo-Szabó MVR, Bechara GH. Acupuncture: Scientific basis and applications. *Ciência Rural*, Santa Maria. 2001; 31 (6): 1091-99.
41. Chae HY, Bong HL, Sung HS. A Possible Mechanism Underlying the Effectiveness of Acupuncture in the Treatment of Drug Addiction. *eCAM*. 2007; 1.
42. Li AH, Zhang JM, Xie YK. Human acupuncture points mapped in rats are associated with excitable muscle/skin–nerve complexes with enriched nerve endings. *Brain Res*. 2004;1012:154–59.
43. Emmel VG. Avaliação do efeito antinociceptivo causado pela estimulação do acuponto Kunlun BL60 (Kunlun) em camundongos. [Dissertação de mestrado]. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina; 2008
44. Yamamura Y. Acupuntura tradicional. A arte de inserir. 2. ed. São Paulo: Roca, 2001. 919 p.
45. Yamamura Y, Filho JL, Novo NF, Puertas EB, Vasconcelos LPWG. Tratamento da hérnia do disco intervertebral lombar pela acupuntura. *Revista Brasileira de Acupuntura*. 1996; 2 (1):13-24.
46. Carneiro NM. Fundamentos da acupuntura médica. Florianópolis: Sistema. 2001, 728 p.
47. Lima DAN, Martins DF, Mazzardo L, Nascimento FP, Santos ARS. Acupuntura no acuponto Kunlun (BL60) acelera a recuperação funcional e reduz a alodínea mecânica e térmica após esmagamento do nervo ciático em camundongos. In: I Congresso IBRO/LARC de Neurociências da América Latina. Búzios, Rio de Janeiro. 2008-10-21

48. Langevin HM, Churchill DL, Cipolla MJ. Mechanical signaling through connective tissue: a mechanism for the therapeutic effect of acupuncture. *Faseb Journal*. 2001;15(12):2275-82.
49. Kawakita K, Gotoh K. Role of polymodal receptors in the acupuncture-mediated endogenous pain inhibitory systems. *Progress in Brain Research*. 1996;113:507–23.
50. Kim HY, Kwon OK, Nam TC. Effect of BL-21 (Wei-Yu) acupoint stimulation on gastric motility following preanesthetic treatment in dogs. *J Vet Sci* 2000;1(2):133-38.
51. Kim HW, Kwon YB, Ham TW, Roh DH, Yoon SY, Lee HJ, et. Al.. Acupoint Stimulation Using Bee Venom Attenuates Formalin-Induced Pain Behavior and Spinal Cord Fos Expression in Rats. *Med Vet Science*. 2003; 65(3): 349-55.
52. Hahmt TS. The Effect of 2 Hz and 100 Hz Electrical Stimulation of Acupoint on Ankle Sprain in Rats. *J Korean Med Sci*. 2007;22:347-51.
53. Cha H, Choi JS, Bai SJ, Shim I, Lee HJ, Choi SM, et al. Antiallodynic effects of acupuncture in neuropathic rats. *Yonsei Med. J*. 2006;47(3):359-66.
54. Moriokan N, Akça O, Doufas AG, Chernyak G, Sessler DI. Electro-Acupuncture at the Zusanli, Yanglingquan, and Kunlun Points Does Not Reduce Anesthetic Requirement *Anesth Analg*. 2002;95:98-102.
55. Lian YL, Chen CY, Hammes M, Kolster BC. Atlas gráfico de acupuntura seirin. *Könemanm*. 1990. p. 162-66
56. Galantino ML, Eje-Okoro ST, Findley TW, Condoluci D. Use of noninvasive electroacupuncture for the treatment of HIV-related peripheral neuropathy: a pilot study. *J Altern Complement Med*. 1999;5(2):135-42i.
57. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1083; 16: 109-10.
58. Santos ARS, Calixto JB. Rhutenium red and capzasepine antinociceptiva effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neurosci Lett*. 1997; 235:73-76.
59. Santos ARS, Miguel OG, Yunes RA, Calixto JB. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dehydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999; 289:417-26.
60. Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chng JM, Yaksh TL. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neur Met*. 1994; 53: 55-63.
61. Seltzer Z, Dubner R, Shir Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial nerve injury. *Pain*. 1990; 43: 205-18.

62. Malmberg AB, Basbaum AI. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. *Pain*. 1998; 76: 215-22.
63. Gadotii VM, Tibola D, Paszcuk AF, Rodrigues ALS, Calixto J, Santos ARS. Contribution of spinal glutamatergic receptors to the antinociception caused by agmatine in mice. *Brain Res*. 2006; 1093: 116-22.
64. Ferreira J, Santos ARS, Calixto JB. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. *Neuropharmacology*. 1999; 38: 835-42.
65. Hylden JL, Wilcox GL. Intrathecal morphine in mice: a new technique. *Eur J Pharmacol*. 1980; 67: 313-16.
66. Montanher AB, Zucolotto SM, Schenkel EP, Fröde TS. Evidence of anti-inflammatory effects of *Passiflora edulis* in an inflammation model. *J Ethnopharm*. 2007; 109: 281–88.
67. Kim HW, Uha DK, Yoon SY, Roh DH, Kwon YB, Lee JH, et. al. Low-frequency electroacupuncture suppresses carrageenan-induced paw inflammation in mice via sympathetic post-ganglionic neurons, while high-frequency EA suppression is mediated by the sympathoadrenal medullary axis. *Brain Research Bulletin* 2008; 75: 698-705.
68. Pagano R, Dias MAA, Dale CS, Giorgi R. Neutrophils and the calcium-binding protein MRP-14 mediated carrageenan-induced antinociception in mice. *Mediators of Inflammation*, **11**, 203–210 (2002).
69. Meotti FC, Missau FC, Ferreira J, Pizzolatti MG, Mizuzaki C, Santos ARS, et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. *Biochemical Pharma*. 2006; 72: 1707-13.
70. McCall WD, Tanner KD, Levine JD. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. *Neurosci Lett*. 1996; 208(1): 45-8.
71. Puig S, Sorkin LS. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. *Pain*. 1996; 64(2): 345-55.
72. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland H, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992; 51: 5-17.
73. Hunskaar S, Hole S. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987; 30: 103.
74. Kwon YB, Kang MS, Han HJ, Beitz AJ, Lee JH. Visceral antinociception produced by bee venom stimulation of the Zhongwan acupuncture point in mice: role of R2 adrenoceptors. *Neuroscience Letters*. 2001; 308: 133-37.

75. Li WM, Cui KM, Li N, Gu QB, Ding GH, Wu GC. Analgesic. Effect of Electroacupuncture on Complete Freund's Adjuvant-Induced Inflammatory Pain in Mice: A Model of Antipain Treatment by Acupuncture in Mice. *Jap J Physiol.* 2005; 55: 339–44.
76. Kawakita K, Shinbara H, Fukuda F, Yano T, Kuriyama K. How do acupuncture act? – Focusing on the progress in Japanese acupuncture research – *J. Pharmacol. Sci.* 2006; 00: 443-59.
77. Linde M, Fjell A, Carlsson J, Dahlöf C. Role of needling per se in acupuncture as prophylaxis for menstrually related migraine: a randomized placebo-controlled study. *Cephalalgia*, 25: 41-47, 2004.
78. Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, Simone DA. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain.* 2001; 89: 221-27.
79. Woolf CJ, Mannion RJ. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Pain* 1999; 353: 1959–64.
80. Mendell JR, Sahenk Z. Painful sensory neuropathy. *N Engl J Med* 2003; 348:1243–55.
81. Dor.inf.br [homepage na Internet]. São Paulo. Inc.; c2000-02 [atualizada em 2000 setembro; acesso em 10 de setembro de 2008]. Disponível em: <http://www.dor.inf.br/Html/Bau/Bau-1-2.html>.
82. Coeytaux1 RR, Kaufman JS, Kaptchuk TJ, Chen W, Miller WC, Callahan LJ, Mann D. A Randomized, Controlled Trial of Acupuncture for Chronic Daily Headache. *Headache.* 2005; 45(9): 1113-23.
83. Dong ZQ, Xie FMH, Wag YQ, Wu GC. Changes of expression of glial cell line-derived neurotrophic factor and its receptor in dorsal root ganglions and spinal dorsal horn during electroacupuncture treatment in neuropathic pain rats. *Institute of Acupuncture Research.* 2003; 2.
84. Li A, Laol L, Ren K, Berman BM, Zhang R, Tan M, et al. Electroacupuncture activates corticotrophin-releasing hormone-containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus to alleviate edema in a rat model of inflammation. *Complementary and Alternative Medicine.* 2008; 8: 20.
85. Zhanga RX, Laoa L, Wanga X, Brian KR, Bermana B. Electroacupuncture combined with indomethacin enhances antihyperalgesia in inflammatory rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior.* 2005; 81: 146 –51.
86. Shan S, Liang MYQ, Hong C, Tingting L, Mei H, Haili P, Qiua ZY, et al. Is functional state of spinal microglia involved in the anti-allodynic and anti-hyperalgesic effects of

electroacupuncture in rat model of monoarthritis? *Neurobiology of Disease*. 2007; 26: 558–68.

87. Sommer C, Kress M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. *Neurosci Lett*. 2004. 6; 361(1-3): 184-7

88. Henriques MG, Weg VB, Martins MA, Silva PM, Fernandes PD, Cordeiro RS, Vargaftig BB (1990). Differential inhibition by two tetrazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. *Br J Pharmacol* 1993; 99: 164-8.